

Philipps



**Universität
Marburg**

**Die osmotische Schutzsubstanz Prolin:
Regulation der Prolinbiosynthese und Bildung eines osmoadaptiven Prolin-
Bypass-Weges durch die evolutionäre Anpassung des Argininanabolismus**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Daniela Stecker
aus Schwerin

Marburg/ Lahn 2016

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von März 2013 bis März 2016 im Laboratorium für Mikrobiologie am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Erhard Bremer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am: 20.07.2016

Gutachter dieser Arbeit waren:

Erstgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Thanbichler

Tag der mündlichen Prüfung am: 11.10.2016

***Frag dich nicht, was richtig ist,
sondern frag dich, was du fühlst.
Hör auf zu fragen, ob du kannst,
sondern frag dich, ob du willst.***

(Antoine de Saint-Exupéry)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
1 Zusammenfassung	9
2 Summary	10
3 Einleitung	11
3.1 Der Modellorganismus <i>B. subtilis</i>	11
3.2 Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes in <i>B. subtilis</i>	12
3.3 Adaption von <i>B. subtilis</i> an hyperosmotische Bedingungen	15
3.4 Die „salt-out“-Strategie	17
3.5 Eigenschaften und Funktion kompatibler Solute	19
3.6 Aufnahme kompatibler Solute aus der Umwelt	20
3.7 Synthese des kompatiblen Soluts Prolin	21
3.8 Regulation der Prolinbiosynthese	24
3.9 Struktur der γ -Glutamyl-Kinase	26
3.10 Zielsetzung	28
4 Material und Methoden	30
4.1 Chemikalien und Materialien	30
4.1.1 Reagenzien und Chemikalien	30
4.1.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	30
4.1.3 Medien	39
4.1.4 Medienzusätze	40
4.2 Mikrobiologische Methoden	41
4.2.1 Wachstumsbedingungen	41

4.2.2	Bestimmung der Zelldichte	42
4.2.3	Bestimmung von Mutationsraten	42
4.3	Molekularbiologische und genetische Methoden	43
4.3.1	Präparation und Nachweis von DNA	43
4.3.2	Transformation von Bakterien	46
4.3.3	Konstruktion von Plasmiden und Bakterienstämmen	48
4.4	Biochemische Methoden	51
4.4.1	Quantifizierung von Proteinen	51
4.4.2	Quantifizierung von Prolin mittels Ninhydrin-Methode	52
4.4.3	Quantifizierung von Aminosäuren mittels HPLC	53
4.4.4	Bestimmung von Enzymaktivitäten	55
4.5	Bioinformatische Methoden	58
4.5.1	Computersoftware	58
4.5.2	Internetplattformen	59
5	Ergebnisse	60
5.1	Regulation der γ -Glutamyl-Kinase in <i>B. subtilis</i>	60
5.1.1	Bioinformatische Analyse der γ -Glutamyl-Kinasen verschiedener <i>Bacillus</i> -Spezies	60
5.1.2	Aminosäure-Substitution im flexiblen Loop der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aus <i>B. subtilis</i>	64
5.1.3	Einfluss der Aminosäure-Substitution in ProB und ProJ auf die osmotische Toleranz von <i>B. subtilis</i>	66
5.1.4	Einfluss der Aminosäure-Substitution in ProB und ProJ auf die intrazelluläre Prolinakkumulation in <i>B. subtilis</i>	68
5.1.5	Einfluss der Aminosäure-Substitution in ProB auf die allosterischen Eigenschaften des Enzyms	70
5.1.6	<i>In silico</i> -Strukturanalyse der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aus <i>B. subtilis</i> sowie deren mutierter Varianten	73

5.2	Umgehung der <i>proA</i> -Deletion im Prolinbiosyntheseweg von <i>B. subtilis</i>	76
5.2.1	Isolierung von Pro ⁺ -Suppressormutanten	78
5.2.2	Lokalisierung der Pro ⁺ -Suppressormutationen im Chromosom von <i>B. subtilis</i>	82
5.2.3	Klasse I: Punktmutation in der regulatorischen Region des <i>argC</i> -Operons	84
5.2.4	Klasse II: Punktmutation im Transkriptionsregulator AhrC	85
5.2.5	Untersuchung des Einflusses der Punktmutationen im <i>argC</i> -Promotor (Klasse I) auf die Transkription des <i>argC</i> -Operons	86
5.2.6	Untersuchung des Einflusses der Punktmutationen im Regulatorprotein AhrC (Klasse II) auf die Transkription des <i>argC</i> -Operons	89
5.2.7	Physiologische Charakterisierung der Pro ⁺ -Suppressormutanten hinsichtlich ihres Wachstums	91
5.2.8	Physiologische Charakterisierung der Pro ⁺ -Suppressormutanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Prolinakkumulation	93
5.2.9	Korrelation zwischen externem Salzgehalt und interner Prolinakkumulation	95
5.2.10	Das Wachstum der Pro ⁺ -Suppressormutanten ist nicht allein von Prolin abhängig	97
6	Diskussion	102
6.1	Der Biosyntheseweg der osmotischen Schutzsubstanz Prolin	102
6.2	Die allosterische Regulation der γ -Glutamyl-Kinase	106
6.3	Überlappung der Prolinbiosynthese und des Argininmetabolismus	111
7	Literaturverzeichnis	117
8	Erklärung	132

Abkürzungsverzeichnis

A₂₃₀	Absorption bei 230 nm
A₂₆₀	Absorption bei 260 nm
A₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BGSC	<i>Bacillus</i> Genetic Stock Center
bp	Basenpaare (base pairs)
BSA	Bovines Serumalbumin
C-terminal	Carboxy-terminal
dH₂O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
Fmoc	9-Fluorenyloxycarbonylchlorid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LB	Luria Bertani
LFH	Long Flanking Homology
MCS	Multiple Cloning Site
NaCl	Natriumchlorid
N-terminal	Amino-terminal
OD₅₇₈	optische Dichte bei 578 nm

OPA	o-Phthaldialdehyd
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pNPG	para-Nitrophenyl- α -Glucopyranosid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sig	Sigmafaktor
SMM	Spizizen's Minimal Medium
SSA	5-Sulfosalicylsäure
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-HCl/Acetat/EDTA
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-Propan-1,3-Diol
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-Indolyl- β -D-Galactosid

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Anpassung von <i>B. subtilis</i> an Hyperosmolarität	18
Abb. 2:	Die zwei Wege der Prolinbiosynthese in <i>B. subtilis</i> und deren Regulation	22
Abb. 3:	Die Verknüpfung der Prolinbiosynthese und des Argininmetabolismus in <i>B. subtilis</i>	23
Abb. 4:	Bindestelle von Prolin im aktiven Zentrum der γ -Glutamyl-Kinase aus <i>E. coli</i> und <i>C. jejuni</i>	26
Abb. 5:	Sequenzvergleich der γ -Glutamylkinasen ProB (Position 133 - 148) und ProJ aus <i>B. subtilis</i>	27
Abb. 6:	Bestimmung der Enzymaktivität der γ -Glutamyl-Kinase mittels γ -GK/ γ -GPR-gekoppelter Reaktion	58
Abb. 7:	Sequenz-Alignment der γ -Glutamyl-Kinase ProB aus <i>B. subtilis</i> und γ -Glutamyl-Kinasen des ProB-Typs verschiedener <i>Bacillus</i> -Spezies	62
Abb. 8:	Sequenz-Alignment der γ -Glutamyl-Kinase ProJ aus <i>B. subtilis</i> und γ -Glutamyl-Kinasen des ProJ-Typs verschiedener <i>Bacillus</i> -Spezies	63
Abb. 9:	Stammkonstruktion Feedback- und T-Box-Mutanten	65
Abb. 10:	Wachstum der <i>B. subtilis</i> Feedback- und T-Box-Deletionsstämme unter hochosmolaren Bedingungen	67
Abb. 11:	Korrelation zwischen Wachstum osmotisch gestresster <i>B. subtilis</i> -Zellen und der Menge an intrazellulär akkumuliertem Prolin	69
Abb. 12:	Wachstum der <i>E. coli</i> CSH26-Derivate pDST16, pDST17 und pDST18 in Minimalmedium	70
Abb. 13:	Feedback-Inhibition der Wildtyp- γ -Glutamyl-Kinase ProB und der mutierten Variante ProB* (E14 2R) aus <i>B. subtilis</i> in An- und Abwesenheit von Prolin	71
Abb. 14:	Aktivität der Wildtyp- γ -Glutamyl-Kinase ProB und der mutierten Variante ProB* (E142R) aus <i>B. subtilis</i> in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Substrates Glutamat	72
Abb. 15:	<i>In silico</i> -Strukturmodelle der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aus <i>B. subtilis</i>	75
Abb. 16:	Biosynthesewege für die anabole und osmoadaptive Prolin-Produktion in <i>B. subtilis</i> und ihre Verbindung zum Arginin-Anabolismus und Arginin-Katabolismus	77

Abb. 17:	Wachstum der <i>B. subtilis</i> <i>proBA</i> - bzw. <i>proA</i> -Deletionsstämme GWB120, GWB128 und DRB4 unter isoosmolaren Bedingungen und in Anwesenheit von 0,8 M NaCl	79
Abb. 18:	Wachstum verschiedener <i>B. subtilis</i> -Deletionsstämme auf Minimal-Agarplatten	80
Abb. 19:	Lokalisierung der Punktmutationen in der <i>argC</i> -Promotorregion	84
Abb. 20:	Lokalisierung der Punktmutationen im Transkriptionsregulator AhrC	86
Abb. 21:	Einfluss der Punktmutationen in der <i>argC</i> _{o1} -Bindestelle innerhalb der regulatorischen Region des <i>argC</i> -Operons auf dessen Transkription	88
Abb. 22:	Einfluss der Punktmutationen im negativen Regulator AhrC auf die Transkription des <i>argC</i> -Operons	90
Abb. 23:	Wachstum der <i>B. subtilis</i> -Pro ⁺ -Suppressormutanten unter Hochsalzbedingungen ..	92
Abb. 24:	Korrelation zwischen Wachstum osmotisch gestresster Pro ⁺ -Suppressormutanten und der Menge an intrazellulär akkumuliertem Prolin	94
Abb. 25:	Einfluss der externen Salzkonzentration auf die Höhe des intrazellulären Prolinpools	96
Abb. 26:	Korrelation zwischen Wachstum osmotisch gestresster <i>B. subtilis</i> Δ <i>proHJ</i> -Mutanten und der Menge an intrazellulär akkumuliertem Prolin	98
Abb. 27:	Korrelation zwischen Wachstum osmotisch gestresster <i>B. subtilis</i> Δ <i>proHJ/proG</i> -Mutanten und der Menge an intrazellulär akkumuliertem Prolin	99
Abb. 28:	Arginingehalt osmotisch gestresster <i>B. subtilis</i> -Pro ⁺ -Suppressormutanten	101

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	30
Tab. 2:	Verwendete <i>B. subtilis</i> -Stämme	31
Tab. 3:	Konstruierte <i>B. subtilis</i> -Stämme	31
Tab. 4:	Verwendete Plasmide	36
Tab. 5:	Konstruierte Plasmide	36
Tab. 6:	Oligonukleotide	37
Tab. 7:	Antibiotika	41
Tab. 8:	PCR-Cycler-Programm für Standard-PCR	45
Tab. 9:	PCR-Cycler-Programm für Fusions-PCR	51
Tab. 10:	Eichgerade BSA	51
Tab. 11:	Injektor-Programm	54
Tab. 12:	Gradient zur Auftrennung von Aminosäuren	54
Tab. 13:	Einstellungen Fluoreszenz-Detektor	55
Tab. 14:	Computersoftware	58
Tab. 15:	Internetplattformen	59
Tab. 16:	Rate für das Auftreten von Pro ⁺ -Suppressormutationen	81
Tab. 17:	Die zwei Klassen von Pro ⁺ -Suppressormutationen	83

1 Zusammenfassung

Das Bodenbakterium *B. subtilis* ist in seinem Habitat starken Schwankungen hinsichtlich Osmolaritäten und Wasserhaushalt ausgesetzt. *B. subtilis* ist in der Lage sich an hochosmolare Wachstumsbedingungen durch die Neusynthese oder die Aufnahme der osmoprotektiven Aminosäure Prolin anzupassen. Die Prolinbiosynthese in *B. subtilis* kann über zwei Wege realisiert werden. Der anabole ProB-ProA-Prol-Weg wird zur Prolinproduktion für die Proteinbiosynthese genutzt. Der osmoadaptive ProJ-ProA-ProH-Weg dient der Bereitstellung großer Prolinmengen für den Einsatz als Osmostress-Schutzsubstanz. Die γ -Glutamylkinasen ProB und ProJ sind Isoenzyme, welche den jeweils ersten Schritt der beiden Prolinbiosynthesewege katalysieren. Sie unterscheiden sich maßgeblich hinsichtlich ihrer Regulation. Die Expression des *proBA*-Operons wird in Anpassung an die intrazelluläre Prolinkonzentration durch ein T-Box-regulatorisches System kontrolliert. Die Expression des *proHJ*-Genclusters steht hingegen unter osmotischer Kontrolle und wird durch den Anstieg der externen Osmolarität induziert. Auf Proteinebene wird das anabole ProB-Enzym durch Prolin allosterisch Feedback-reguliert. Das osmoadaptive ProJ-Enzym unterliegt scheinbar keiner solchen posttranskriptionellen Regulation.

Die Feedback-Inhibition wird durch einen 16 Aminosäuren langen flexiblen Loop im aktiven Zentrum der γ -Glutamyl-Kinase moduliert. Die γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ zeigen hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz einen signifikanten Unterschied in diesem Loop. Das durch Prolin Feedback-inhibierte Enzym ProB aus *B. subtilis* weist einen negativen Glutamat-Rest an der Aminosäure-Position 142 im flexiblen Loop auf, während das ProJ-Protein einen positiv geladenen Arginin-Rest an der entsprechenden Position zeigt. Mit Hilfe bioinformatischer Analysen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die negative Aminosäure Glutamat in Enzymen des ProB-Typs und die positive Aminosäure Arginin in Enzymen des ProJ-Typ innerhalb der Gattung *Bacillus* hochkonserviert sind. Auf Grundlage dieser bioinformatischen Analysen wurden *B. subtilis*-Mutanten konstruiert, bei denen die negative Aminosäure Glutamat im anabolen ProB gegen die positive Aminosäure Arginin (E142R) ausgetauscht wurde. Umgekehrt wurde im osmoadaptiven ProJ-Enzym Arginin gegen Glutamat ausgetauscht. Die Aminosäuresubstitution in ProB führt zu einer verminderten allosterischen Regulation des Proteins, welche mit einer erhöhten Prolinakkumulation *in vivo* sowie einer gesteigerten osmotischen Toleranz einhergeht. Der Austausch in ProJ führt hingegen zu einer erhöhten allosterischen Regulation und bewirkt eine verminderte Prolinakkumulation sowie eine geringere osmotische Toleranz. Die gezeigten Daten beweisen, dass die γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aufgrund ihrer unterschiedlichen allosterischen Regulation bestens auf ihre physiologische Funktion im anabolen oder osmoadaptiven Prolinbiosyntheseweg in *B. subtilis* abgestimmt sind.

Die anabole und die osmoadaptive Prolinbiosynthese in *B. subtilis* sind über das gemeinsam genutzte Enzym ProA miteinander verknüpft. Da kein paralogenes Enzym existiert, führt die Deletion von ProA zu einer massiven Reduktion der Prolinbiosynthese. Die vorliegende Arbeit zeigt Suppressormutanten, die in der Lage sind über die Rekrutierung von Enzymen des Argininstoffwechsels sowohl die anabole als auch die osmoprotektive Prolinbiosynthese aufrecht zu erhalten. Zwei Klassen von Mutationen konnten identifiziert werden: Zum einen Mutationen in der Promotorregion von des *argC*-Operons, welches für Gene der Argininsynthese kodiert. Zum anderen Mutationen im Regulatorprotein AhrC, welches als Repressor für die Transkription des *argC*-Operons fungiert. Beide Klassen von Mutationen führen zu einer verschlechterten Bindung des Transkriptionsrepressors AhrC an seine Operatorregion im Promotorbereich des *argC*-Operons und folglich zu einer erhöhten Expression des *argC*-Operons und zu größeren Ornithin-Pools in der Zelle. *B. subtilis* ist dazu in der Lage ausgehend von Ornithin mittels RocD, einem Enzym des Arginin-Katabolismus, dasselbe Produkt wie ProA zu bilden und kann folglich dessen Fehlen ersetzen. Desweiteren liefert die vorliegende Arbeit erste Hinweise darauf, dass die Aminosäure Arginin unter bestimmten Voraussetzungen ebenfalls als osmotische Schutzsubstanz von *B. subtilis* genutzt werden kann. Die gezeigten Untersuchungen demonstrieren die Fähigkeit von Bakterien sich flexibel an Beeinträchtigungen essentieller Stoffwechselwege anzupassen.

2 Summary

B. subtilis lives in the upper layers of the soil and must therefore adapt to strong variations of osmolarity and water content. The soil bacterium can adapt to high osmolarity growth conditions through the osmotically induced *de novo* synthesis or the uptake of the compatible solute and osmoprotectant proline. *B. subtilis* possesses interlinked pathways for the synthesis of proline. The anabolic ProB-ProA-ProL route provides proline for protein biosynthesis, whereas the ProJ-ProA-ProH route is responsible for the high-level production of proline as an osmoprotectant. The first step of both pathways is catalyzed by the γ -glutamyl kinases ProB and ProJ. These isoenzymes show essential differences regarding their regulation. The transcription of the *proBA* operon is controlled in response to intracellular proline levels via a T-box regulatory element, whereas the transcription of the *proHJ* gene cluster is up-regulated in response to increases in the external osmolarity. ProB is feedback regulated by proline, but such a post-transcriptional regulation is unlikely to control the enzyme activity of ProJ.

The enzyme-inhibitor-interaction is modulated by a flexible 16-residue loop in the active center of the γ -glutamyl kinase. ProB and ProJ from *B. subtilis* reveal a striking difference regarding the amino acid sequence of this loop. The feedback inhibited ProB enzyme possesses a negative glutamate residue at position 142 in the flexible loop, whereas the ProJ enzyme possesses a positively charged Arg residue at the corresponding region. Bioinformatic analysis revealed that the negative amino acid glutamate in enzymes of the ProB type and the positive amino acid arginine in enzymes of the ProJ type is highly conserved within the genus *Bacillus*. Based on these bioinformatic analysis we created *B. subtilis* mutants with a substitution of the negatively charged amino acid glutamate of the anabolic ProB enzyme against a positively charged amino acid arginine by site directed mutagenesis. Vice versa, we replaced arginine in the osmoadaptive ProJ enzyme by glutamate. The amino acid substitution in ProB caused a decreased allosteric regulation of the protein and led to an increase in the cellular proline pool and the osmotic tolerance. Conversely, the amino acid substitution in ProJ causes an increased allosteric regulation of the protein and led to a decreased proline accumulation *in vivo* and a reduced osmotic tolerance. Our data strongly suggest that the different allosteric controls of the ProB and ProJ are well integrated into the physiological functions of either the anabolic or osmoprotectant adaptive proline synthesis routes of *B. subtilis*.

The anabolic and the osmoadaptive proline pathways in *B. subtilis* are connected via the shared ProA protein. Because no paralogous protein to ProA exists, the deletion of the *proA* gene leads to a perturbation in proline biosynthesis. Suppressor mutations within the *ahrC* region and the *argCJBD-carAB-argF* region recruit enzymes of the arginine metabolism for the synthesis of proline. The suppressor mutations were of two types: First were mutations in the promoter region of *argCJBD-carAB-argF*, which encodes for genes of the arginine biosynthetic pathway. Second were mutations in the regulator protein AhrC, which represses the transcription of the *argC* operon. Both types of mutants result in a diminished binding of the transcription repressor AhrC to its operator region and enhance the transcription of the *argC* operon leading to increased amounts of ornithine within the cell. Ornithine can be converted via the RocD enzyme. RocD as part of the arginine degradation pathway synthesizes the same reaction product as the ProA enzyme and thereby bypassing the ProA mediated enzyme reaction. Furthermore our investigations suggest that under certain conditions the amino acid arginine can also be used as an osmoprotectant by *B. subtilis*. The data acquired in this dissertation demonstrate how effective bacteria can adapt to limitations on their essential biosynthetic pathways.

3 Einleitung

Bakterien gehören zu den am weitesten verbreiteten Organismen auf der Erde (Curtis und Sloan, 2004; Whitman *et al.*, 1998) und sind ubiquitär in allen Lebensräumen vorzufinden (Earl *et al.*, 2008). In ihrer natürlichen Umgebung sind Mikroorganismen mit einer Vielzahl schwankender, abiotischer Parameter konfrontiert. Neben Nährstoffverfügbarkeit, Temperatur, pH-Wert, Druck, Strahlung und Sauerstoffverfügbarkeit spielen auch die osmotischen Verhältnisse im Habitat eine wichtige Rolle (van Veen *et al.*, 1997; Galinski und Trüper, 1994; Potts, 1994). Vor allem Mikroorganismen, die die oberen Bodenschichten besiedeln, unterliegen häufig starken osmotischen Schwankungen, welche mit wechselnden Perioden von Austrocknung durch Sonneneinstrahlung und Überflutung durch Regen einhergehen (Ventosa *et al.*, 1998; Miller und Wood, 1996). Mikroorganismen, die sich unter solchen Bedingungen ansiedeln, haben eine große Vielfalt von Anpassungsstrategien entwickelt, um ihr Überleben zu sichern (Oren, 2008; Foster, 2007; Guerrero und Berlanga, 2006). Ein Vertreter dieser im Boden lebenden Bakterien ist *Bacillus subtilis*.

3.1 Der Modellorganismus *B. subtilis*

B. subtilis ist ein stäbchenförmiges und peritrich begeißeltes Bakterium, welches dem Phylum der *Firmicutes* zugeordnet werden kann (Guttenplan *et al.*, 2013; Sargent, 1975). Der Gram-positive Mikroorganismus ist durch eine chemoorgano-heterotrophe Lebensweise gekennzeichnet und wächst unter fakultativ aeroben Bedingungen (Härtig und Jahn, 2012). *B. subtilis* ist vorwiegend in den oberen Bodenschichten vorzufinden, konnte aber auch aus marinen Habitaten und dem Intestinaltrakt von Tieren isoliert werden (Earl *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2006; Ivanova *et al.*, 1999). Unter ungünstigen Umweltbedingungen ist *B. subtilis* dazu in der Lage Endosporen zu bilden, welche eine hohe Resistenz gegenüber einer Vielzahl physikalischer und chemischer Einflüsse aufweisen. Diese verschaffen dem Bakterium die Möglichkeit mehrere Jahre zu überdauern und unter günstigeren Umweltbedingungen wieder auszukeimen (Errington, 1993). Aufgrund seiner guten Zugänglichkeit für molekularbiologische Modifikationen und der vorliegenden Nukleotidsequenz des gesamten Genoms steht *B. subtilis* als Modellorganismus für

Gram-positive Bakterien im Mittelpunkt der mikrobiologischen Forschung (Barbe *et al.*, 2009; Srivatsan *et al.*, 2008; Kunst *et al.*, 1997). Auch in der Industrie findet *B. subtilis* eine vielfältige Anwendung in der Produktion kommerzieller Substanzen. So werden die Zellen oder Sporen dieses Bakteriums zur Behandlung von gastrointestinalen Störungen beim Menschen angewandt. In der Landwirtschaft wird *B. subtilis* als biologisches Fungizid für Samen von z.B. Baumwolle und Sojabohnen eingesetzt. *B. subtilis* besiedelt während der Keimung das Wurzelsystem und beugt durch Konkurrenz Verpilzungen vor (Mongkolthanaruk, 2012). *B. subtilis* wird ebenfalls für die Herstellung von Waschmittelenzymen (z.B. Subtilisin), für die Synthese von Vitamin B₂ (Riboflavin) und für die Herstellung von Antibiotika (z.B. Bacitracin) in der biotechnologischen Industrie genutzt (Bacher *et al.*, 2000; Azevedo *et al.*, 1993; Pierce *et al.*, 1992; Craig *et al.*, 1949).

3.2 Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes in *B. subtilis*

Mikroorganismen sind in ihrer natürlichen Umwelt starken Schwankungen abiotischer Faktoren ausgesetzt (Miller und Wood, 1996). Besonders die Verfügbarkeit von Wasser in einem Habitat stellt einen kritischen Parameter für das Überleben von Mikroorganismen dar (Galinski und Trüper, 1994; Potts, 1994). Als Bewohner der oberen Bodenschichten ist *B. subtilis* einer ständig wechselnden Wasserverfügbarkeit und damit einhergehenden Schwankungen der Osmolarität ausgesetzt (Ventosa *et al.*, 1998; Miller und Wood, 1996; Galinski und Trüper, 1994).

Bakterien sind von einer semipermeablen Zytoplasmamembran umgeben, welche sich aus einer Lipid-Doppelschicht sowie Proteinen zusammensetzt und die osmotischen Eigenschaften der Zelle bestimmt. Sie ist undurchlässig für geladene Substanzen und Makromoleküle. Wasser kann hingegen frei durch die Membran diffundieren (Galinski, 1993; Bovell *et al.*, 1963). Das Zytoplasma ist eine wässrige Lösung osmotisch aktiver Substanzen, welches in der Regel ein höheres osmotisches Potential aufweist als das umgebende Medium. Dies führt zu einem Einstrom von Wasser entlang des osmotischen Gradienten in die Zelle. Dadurch wird im Inneren der Zelle ein hydrostatischer Druck aufgebaut, der sogenannte Zellturgor (Wood *et al.*, 2001; Bremer und Krämer, 2000). Der Turgor ist essentiell für die

Erhaltung des Zellvolumens. Zudem spielen die durch den Turgor vermittelten mechanischen Kräfte eine wichtige Rolle bei der Ausdehnung der Zelle während des Wachstums sowie für die Zellteilung (Bremer und Krämer, 2000; Höltje, 1998; Koch, 1982). Der Zellturgor Gram-negativer Organismen liegt bei 3 bis 5 bar (Koch, 1984). Gram-positive Bakterien weisen hingegen aufgrund ihres sehr stabilen Mureinsacculus einen deutlich höheren Turgor von 15 bis 20 bar auf (Czonka, 1989). Für *B. subtilis* konnte ein Turgor von 19 bar ermittelt werden (Whatmore und Reed, 1990).

Umweltbedingte Schwankungen der externen Osmolarität beeinflussen unmittelbar den Wasserfluss über die Zytoplasmamembran (Booth, 2014). Anhaltende Regenfälle führen zu einer raschen Verdünnung der im Bodenwasser enthaltenen Substanzen. Es entsteht eine hypoosmolare Umgebung wobei die Konzentration der gelösten Stoffe im extrazellulären Raum die Konzentration der gelösten Ionen im Zytoplasma unterschreitet. Hypoosmotische Bedingungen bewirken einen Wassereinstrom in die Zelle entlang eines osmotischen Gradienten und führen zu einem Anstieg des Zellturgors (Czonka, 1989). Der Druckanstieg kann in der Regel durch die bakterielle Zellwand aufgefangen werden (Carpita, 1985), wobei es zu einer Zunahme des Zellvolumens kommt (Czonka und Epstein, 1996). Im Extremfall führen hyperosmotische Bedingungen zum Platzen der Zelle. Während langer Trockenperioden nimmt der Boden hingegen einen hyperosmotischen Charakter an, wobei die Konzentration der extrazellulär gelösten Stoffe die der gelösten Ionen im Zytoplasma überschreitet. Hyperosmolare Bedingungen führen zu einem Wasserausstrom aus der Zelle, welcher mit dessen Dehydrierung und einer Verringerung des Zytoplasmavolumens und des Zellturgors einhergeht (Abb. 1). Im Extremfall kommt es zu einem vollständigen Zusammenbruch des Turgors. Dieser als Plasmolyse bezeichnete Prozess bewirkt die Ankonzentrierung von Zellinhaltsstoffen und damit die Inhibition zahlreicher physiologischer Prozesse, wie z.B. die DNA-Replikation (Pittelkow und Bremer, 2011; Bremer und Krämer, 2000; Meury, 1988).

Aufgrund der osmotisch induzierten Wasserströme über die Lipiddoppelschicht der Zytoplasmamembran ist ein effektives Wassermanagement von zentraler Bedeutung für das Überleben und das Wachstum von Mikroorganismen in Habitaten mit ständig schwankenden Osmolaritäten. In pflanzlichen und tierischen Zellen sind

Membran-durchspannende wasserselektive Kanäle, sogenannte Aquaporine sehr verbreitet (Johansson *et al.*, 2000; Preston *et al.*, 1992), welche bei einer Änderung der Osmolarität der Umgebung eine sehr rasche und effiziente Wasserpermeation in beide Richtungen durch die Zytoplasmamembran erlauben (Tanghe *et al.*, 2006; Delamarche *et al.*, 1999; Maurel, 1997; Agre *et al.*, 1995). Das Protein AqpZ aus *E. coli* dient als Modell für bakterielle Aquaporine (Booth und Louis, 1999; Ringler *et al.*, 1999; Calamita *et al.*, 1998; Calamita *et al.*, 1995). In *B. subtilis* wurde, wie in vielen anderen Gram-positiven Organismen, bisher kein verwandtes Protein gefunden (Calamita, 2000). Die Bedeutung der Aquaporine bei der Anpassung an hyperosmolare Bedingungen konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden (Tanghe *et al.*, 2006; Soupene *et al.*, 2002; Calamita *et al.*, 1998).

Da Mikroorganismen nicht dazu in der Lage sind Wasser aktiv, das heißt unter Energieverbrauch, über die Zellmembran zu transportieren, regeln sie den Wassereinstrom und den Wasserausstrom und folglich auch den Zellturgor über das osmotische Potential des Zytoplasmas (Bremer, 2002; Kempf und Bremer, 2000; Galinski, 1993;). Unter hyperosmotischen Bedingungen ist die intrazelluläre Anhäufung von osmotisch aktiven Teilchen erforderlich. Im Gegensatz dazu muss nach einem hypoosmotischen Schock die rasche Exkretion dieser Teilchen stattfinden.

Eine Vielzahl von Mikroorganismen nutzt dehungsaktivierbare Kanäle, welche in der Plasmamembran lokalisiert sind, um sich auf eine sehr schnelle und effektive Weise an hypoosmotische Bedingungen anzupassen. Die Öffnung dieser sogenannten mechanosensitiven Kanäle beruht auf einem steigenden zytoplasmatischen Turgordruck und ermöglicht nach einem hypoosmotischen Schock innerhalb von Sekunden den massiven Ausstrom osmotisch aktiver Teilchen (Batiza *et al.*, 1999; Blount und Moe, 1999; Sukharev *et al.*, 1997). Zwei dieser mechanosensitiven Kanäle, MscL (Sukharev *et al.*, 2001; Ajouz *et al.*, 1998; Blount *et al.*, 1997) und MscS (Levina *et al.*, 1999), konnten für *E. coli* eingehend charakterisiert werden. Hierbei wurde gezeigt, dass diese eine herausragende Rolle für das Überleben eines hypoosmotischen Schocks spielen (Booth und Louis, 1999; Levina *et al.*, 1999). Auch in *B. subtilis* konnten verwandte Kanäle zu den zwei in *E. coli* beschriebenen Kanalproteinen identifiziert werden (Hoffmann *et al.*, 2008; Moe *et al.*, 1998). Hierbei zeigte YwpC (MscL) aus *B. subtilis* eine hohe Sequenzhomologie zu dem

MscL-Protein aus *E. coli* (Moe *et al.*, 1998), während die Proteine YhdY, YkuT und YfkC aus *B. subtilis* eine Homologie zu dem *E. coli*-Protein MscS aufwiesen (Levina *et al.*, 1999). Umfangreiche Mutationsanalysen aller potentiell Kanal-formenden Gene in *B. subtilis* haben gezeigt, dass eine Vierfachmutante (*mscL*, *yhdY*, *ykuT* und *yfkC*) vergleichend zum Wildtyp keinen Wachstumsnachteil in Hochsalzmedien verursacht. In osmotischen „down-shock“-Experimenten konnte geklärt werden, dass der MscL-Kanal in *B. subtilis* das Hauptsystem für die Freisetzung osmotisch aktiver Teilchen ist. Stämme mit einem Defekt im *mscL*-Gen weisen nach osmotischem „down-shock“ eine stark verminderte Überlebensrate auf. Obwohl der MscS-Typ-Kanal YkuT nur eine untergeordnete Rolle bei der Freisetzung von Soluten spielt, erhöht die Kombination mit einer *yktU*-Mutation und einer *mscL*-Mutation die Sensitivität von *B. subtilis* nach einem Abfall der externen Osmolarität (Hoffmann *et al.*, 2008).

3.3 Adaption von *B. subtilis* an hyperosmotische Bedingungen

Um das Überleben und Wachstum unter erhöhten Salzkonzentrationen zu sichern ist *B. subtilis* auf genetischer Ebene dazu in der Lage verschiedene Stressantworten zu geben (Völker *et al.*, 1999; Hecker und Völker, 1998; Hecker *et al.*, 1996). Proteomanalysen haben gezeigt, dass die durch einen plötzlichen Anstieg der Osmolarität induzierten Proteine in zwei Gruppen, die generellen und die salzspezifischen Stressproteine, unterteilt werden können (Bernhardt *et al.*, 1997).

Die generelle Stressantwort vermittelt einen Schutz gegenüber einer Vielzahl von Stressfaktoren wie Hitze, Ethanol, Nährstoffmangel, Sauerstofflimitation oder eine erhöhte Salzkonzentration (Völker *et al.*, 1999; Hecker und Völker, 1998; Bernhardt *et al.*, 1997; Hecker *et al.*, 1996). Das generelle Stressregulon wird durch den alternativen Transkriptionsfaktor SigB gesteuert (Petersohn *et al.*, 2001; Price *et al.*, 2001; Price, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass SigB-Mutanten nach einem plötzlichen wachstumslimitierenden Salzstress eine deutlich geringere Überlebensrate aufwiesen als der Wildtyp (Völker *et al.*, 1999).

Die spezifische Stressantwort von *B. subtilis* beinhaltet die Synthese und Aufnahme verschiedener organischer Osmolyte, im Besonderen Prolin und Glycin-Betain (Bremer und Krämer, 2000; Kempf und Bremer, 1998).

Die Bildung von Endosporen (Sonnenshein, 2000) stellt hingegen für *B. subtilis* keine Alternative dar, um auf einen Anstieg der externen Salzkonzentration zu reagieren. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass unter Salzstress eine Inhibition der Sporulation stattfindet (Widderich *et al.*, 2016; Ruzal *et al.*, 1998; Ruzal und Sanchez-Rivas, 1998; Kunst und Rapoport, 1995). Hierbei ist sowohl die Transkription von Spo0A als auch von SigH durch Salz gehemmt. Weiterhin konnte unter Salzstress eine verminderte Interaktion von SigH mit der RNA-Polymerase gezeigt werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass salzgestresste Zellen aufgrund der Synthese großer Polinmengen einer enormen physiologischen Aufgabe gegenüberstehen und folglich dem biosynthetisch und energetisch aufwändigen Prozess der Sporulation nicht gewachsen sind (Widderich *et al.*, 2016).

Für die Anpassung an hyperosmotische Bedingungen können Mikroorganismen prinzipiell zwei Strategien verfolgen. Halophile Bakterien akkumulieren Ionen, vorrangig Kalium- und Chlorid-Ionen, um ein Leben in hochosmolaren Habitaten führen zu können (Kempf und Bremer, 2000; Roberts, 2000; Welsh, 2000; Galinski, 1993; Zhilina und Zavarzin, 1990). Diese Strategie wird als „salt-in“-Strategie bezeichnet. Aufgrund der hohen intrazellulären Ionen-Konzentrationen sind halophile Organismen in ihrer Kolonisation auf hochsaline Habitate beschränkt, da sämtliche physiologische Prozesse und Zellkomponenten speziell auf eine solche Umgebung abgestimmt sind. Untersuchungen haben gezeigt, dass halophile Proteine sich maßgeblich von ihren nicht halophilen Homologen unterscheiden und durch einen hohen Anteil saurer Aminosäuren gekennzeichnet sind. Die daraus resultierende negative Oberflächenladung der Proteine erhöht unter Hochsalzbedingungen die Stabilität ihrer Hydrathülle und hat folglich einen positiven Effekt auf ihre Löslichkeit und Flexibilität. Niedrige Salzkonzentrationen führen hingegen aufgrund der sich abstoßenden Ladungen zu einer Denaturierung dieser Proteine (Mevarech *et al.*, 2000).

Im Gegensatz dazu stellt die Anhäufung von Kaliumionen in halotoleranten Bakterien nur eine kurzfristige Übergangslösung dar, da hohe Ionen-Konzentrationen zelluläre Vorgänge massiv beeinträchtigen. In *B. subtilis* und vielen weiteren halotoleranten Bakterien erfolgt die langfristige Adaptation an hochosmolare Bedingungen über die sogenannte „salt-out“-Strategie (Bremer, 2002; Gouffi und Blanco, 2000;

da Costa *et al.*, 1998; Galinski, 1993). Hierbei wird das akkumulierte Kalium durch niedermolekulare organische Verbindungen, sogenannte kompatible Solute, ersetzt, welche keinen negativen Einfluss auf den Zellstoffwechsel ausüben.

Motile Bakterien sind darüber hinaus in der Lage mittels gerichteter Bewegung eine ungünstige osmotische Umgebung zu verlassen. Dieser als negative Osmotaxis bezeichnete Vorgang ermöglicht Bakterien die Flucht aus hyper- bzw. hypoosmotischen Bereichen in eine Umgebung optimaler Osmolarität (Li *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1995).

3.4 Die „salt-out“-Strategie

B. subtilis und weitere halotolerante Bakterien verfolgen für die langfristige Adaption an hochosmolare Bedingungen die sogenannte „salt-out“-Strategie (Bremer, 2002; Gouffi und Blanco, 2000; da Costa *et al.*, 1998; Galinski, 1993). Nach einem hyperosmotischen Schock zeigt *B. subtilis* hierbei einen zweiphasigen Anpassungsprozess (Abb. 1).

In einem ersten Schritt kommt es direkt nach der Zunahme der externen Osmolarität zu einer schnellen und massiven Akkumulation von Kaliumionen (Whatmore *et al.*, 1990; Whatmore und Reed, 1990). Die Aufnahme von Kalium in die Zelle wird hierbei über das hochaffine Transportsystem KtrAB und das niederaffine Transportsystem KtrCD vermittelt (Holtmann *et al.*, 2003). Die Ktr-Transportsysteme bestehen aus einer integralen Membrankomponente, welches strukturelle Ähnlichkeiten zu K⁺-Kanälen aufweist, und einer membranassoziierten Komponente. Für *Staphylococcus aureus* konnte die Regulation von KtrAB durch das zyklische Dinukleotid c-di-AMP gezeigt werden (Corrigan und Gründling, 2013). Der sekundäre Botenstoff c-di-AMP bindet hierbei an KtrA und inhibiert den Transport von Kaliumionen. Der gleiche Regulationsmechanismus konnte auch für die KtrA-Untereinheit des KtrAB-Transporters aus *B. subtilis* gezeigt werden (Bai *et al.*, 2014; Corrigan und Gründling, 2013). Neben der direkten Regulation durch c-di-AMP ist auch eine indirekte Regulation des *ktrA*-Gens auf mRNA-Ebene möglich. Die indirekte Regulation erfolgt über den *ydaO*-Riboswitch, welcher in der 5'UTR von *ktrAB* lokalisiert ist und den Liganden c-di-AMP bindet.

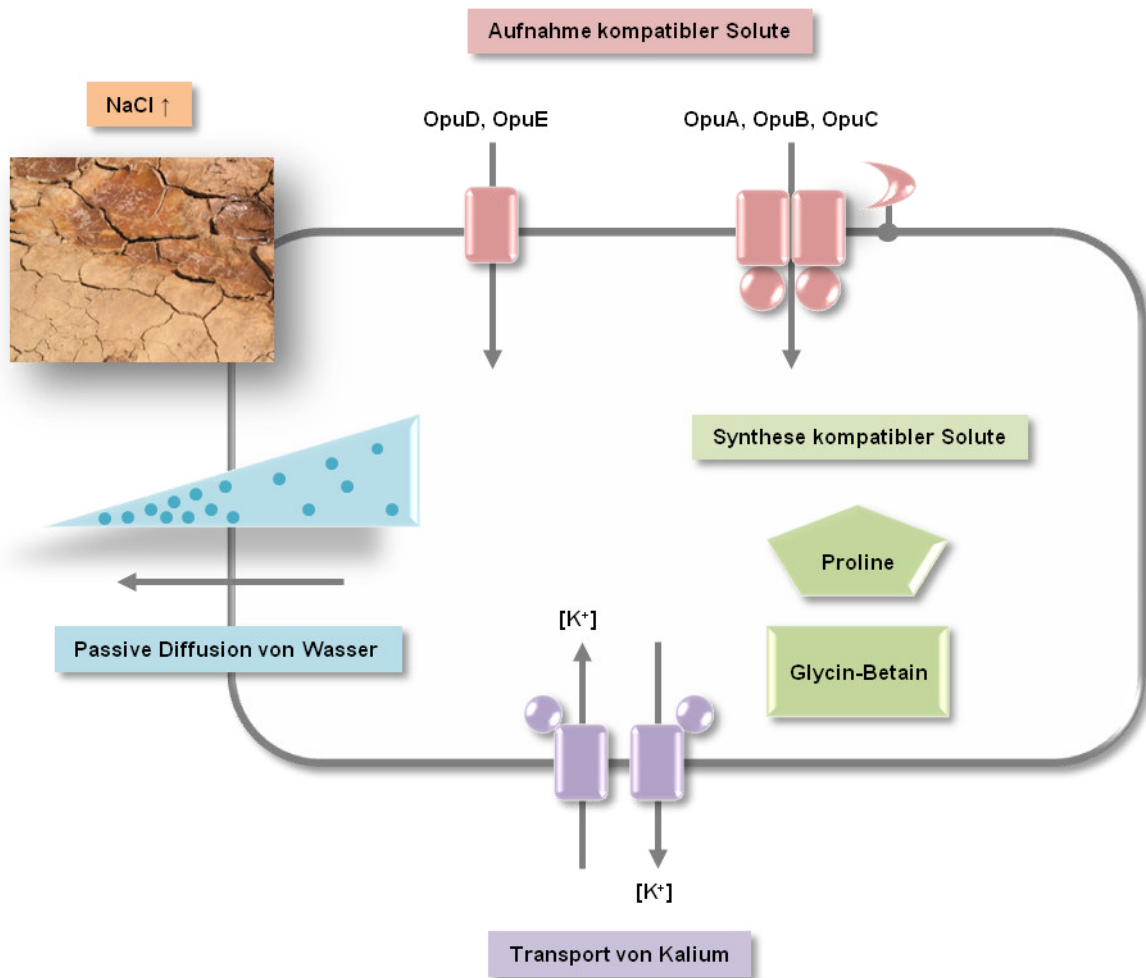


Abb. 1: Anpassung von *B. subtilis* an Hyperosmolarität

Dargestellt ist die Anpassung von *B. subtilis* an hyperosmotische Bedingungen. Höhere Solutkonzentrationen im extrazellulären Raum führen zu einem Wasserausstrom aus der Zelle. Die Adaption an hyperosmotische Bedingungen erfolgt in zwei Schritten: Hierbei werden zunächst Kaliumionen durch aktiven Transport in der Zelle akkumuliert. In einem zweiten Schritt werden kompatible Solute über die Transportsysteme OpuA bis OpuE aufgenommen oder von der Zelle synthetisiert (Prolin, Glycin-Betain). Die Akkumulation kompatibler Solute geht mit dem Export von Kalium aus der Zelle einher (modifiziert nach Pittelkow und Bremer, 2001).

Die Bindung von c-di-AMP führt zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription (Corrigan und Gründling, 2013; Nelson *et al.*, 2013). Die Akkumulation von Kaliumionen nach einem osmotischen „up-shock“ ermöglicht eine schnelle Stabilisierung des Zellurgors und verhindert die Dehydrierung und Plasmolyse der Bakterienzelle. Langfristig erhöhte intrazelluläre Kaliumkonzentrationen haben hingegen einen negativen Effekt auf zahlreiche physiologische Prozesse, wie z.B. DNA-Protein-Interaktionen und die Funktion von Proteinen. Da Kaliumionen über die Ktr-Systeme nur in Verbindung mit Natriumionen in die Zelle transportiert werden (Corratge-Faillie *et al.*, 2010), führt ein hyperosmotischer Schock nicht nur zur

Erhöhung des intrazellulären Kaliumpools, sondern gleichzeitig auch zu einem Anstieg der Natriumkonzentration auf ein toxisches Level. Daher werden in einem zweiten Schritt die akkumulierten Kaliumionen gegen kompatible Solute ersetzt, welche eine langfristige Anpassung an hochosmotische Bedingungen gewährleisten (Whatmore *et al.*, 1990). Die Kalium-Ionen werden über Kaliumexporter (YhaSTU, YugO) aus der Zelle transportiert (Prindle *et al.*, 2015; Fujisawa *et al.*, 2007; Fujisawa *et al.*, 2004).

3.5 Eigenschaften und Funktion kompatibler Solute

Die Akkumulation kompatibler Solute ist nicht nur in Bakterien (Bremer und Krämer, 2000; da Costa *et al.*, 1998; Galinski und Trüper, 1994; Czonka, 1989) und Archaeen (Roberts, 2000; Martin *et al.*, 1999) verbreitet, sondern findet sich auch in Pilzen, Pflanzen, Tieren und menschlichen Zellen (Sakamoto und Murata, 2000; Burg und Kültz, 1997; Hohmann, 1997). Kompatible Solute sind niedermolekulare, organische Verbindungen, die bei niedriger externer Wasseraktivität in hohen Konzentrationen im Zytoplasma akkumuliert werden, ohne dabei physiologische Prozesse in der Zelle zu beeinträchtigen (Yancy, 1994; Arakawa und Timasheff, 1985; Brown, 1976). Dies ist möglich, weil kompatible Solute durch eine gute Wasserlöslichkeit gekennzeichnet sind, bei einem physiologischen pH-Wert von 7 keine Nettoladung aufweisen und nicht direkt mit Proteinen interagieren (Czonka, 1989). Die Akkumulation von kompatiblen Soluten vermindert die osmotische Potentialdifferenz zwischen Zelle und Umgebung und verhindert unter hyperosmotischen Bedingungen den Ausstrom von Wasser aus der Zelle. Desweiteren besitzen kompatible Solute die Fähigkeit Proteine bei hoher Ionenstärke zu stabilisieren und deren native Konformation zu schützen. Diese Eigenschaft kann mit dem Modell der „präferentiellen Exklusion“ erklärt werden. Hierbei werden kompatible Solute aufgrund von ähnlich hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Rückrat der Proteine aus deren Hydrathülle ausgeschlossen und lagern sich schützend um das Protein an (Street *et al.*, 2006; Bolen und Baskakov, 2001; Qu *et al.*, 1998). Aufgrund ihrer Protein-stabilisierenden Eigenschaften werden kompatible Solute auch als chemische Chaperone bezeichnet. Desweiteren zeichnen sich kompatible Solute durch ihre kälte- und thermoprotektive Wirkung aus (Bashir *et al.*, 2014; Hoffmann und Bremer, 2011; Holtmann und Bremer, 2004).

Aus chemischer Sicht lassen sich die kompatiblen Solute verschiedenen Stoffklassen zuordnen. So werden Aminosäuren und Aminosäurederivate (z.B. Glutamat, Prolin, Prolin-Betain), Zucker und Polyole (z.B. Trehalose, Glyzerin), Trimethylammonium-Verbindungen (z.B. Glyzin-Betain, Carnitin, Dimethylsulfoniopropionat), Sulfat-Ester (z.B. Choli-O-Sulfat) sowie Tetrahydropyrimidine (z.B. Ectoin, Hydroxy-Ectoin) genutzt (Pittelkow und Bremer, 2011; Bremer und Krämer, 2000; Kempf und Bremer, 1998). Für *B. subtilis* sind bisher 13 Substanzen bekannt, welche als kompatible Solute fungieren (Hoffmann und Bremer, 2011).

3.6 Aufnahme kompatibler Solute aus der Umwelt

Die Akkumulation kompatibler Solute in der Zelle kann sowohl über die Aufnahme exogen vorliegender Substanzen als auch über die endogene *de novo* Synthese realisiert werden (Czonka und Epstein, 1996).

B. subtilis nimmt ein breites Spektrum exogen vorliegender Substanzen auf. Hierbei handelt es sich um natürlich vorkommende Osmoprotektiva, welche entweder von Pflanzen oder Mikroorganismen in das Ökosystem abgegeben werden. Primäre Quellen sind hierbei Wurzelexudate sowie verrottende Pflanzen- und Bakterienzellen (Welsh, 2000; Galinski und Trüper, 1994). *B. subtilis* ist in der Lage externe Solute über die fünf osmotisch induzierbaren, spezifischen Transporter OpuA, OpuB, OpuC, OpuD und OpuE aus der Umwelt aufzunehmen (Abb. 1). Die Opu-Aufnahmesysteme zeigen eine überlappende Substratspezifität. Bei den Transportern OpuA, OpuB und OpuC handelt es sich um hochaffine ABC-Transporter; OpuD und OpuE sind sekundäre Transporter (Kappes *et al.*, 1999; Kempf *et al.*, 1997; von Blohn *et al.*, 1997; Kappes *et al.*, 1996; Kempf und Bremer, 1995) (Abb. 1).

Die *de novo* Synthese in Mikroorganismen ist meist auf ein bis zwei kompatible Solute beschränkt. *B. subtilis* ist der Lage Prolin *de novo* zu synthetisieren (Whatmore *et al.*, 1990). Die Synthese von Glycin Betain kann hingegen nur nach externer Aufnahme des Vorläufermoleküls Cholin erfolgen (Boch *et al.*, 1994).

Da der Import kompatibler Solute aufgrund eines geringeren Energieaufwandes physiologisch vorteilhafter für osmotisch gestresste Zellen ist (Pittelkow und Bremer, 2011), werden Prolin und Glycin-Betain nicht nur *de novo* synthetisiert, sondern auch

über die Opu-Transportsysteme in die Zelle aufgenommen. So wird Glycin-Betain über OpuA, OpuB und OpuC aufgenommen (Kappes *et al.*, 1999; Kappes *et al.*, 1996; Kempf und Bremer, 1995), während Prolin über den Transporter OpuE in die Zelle gelangt (von Blohn *et al.*, 1997).

Um osmoprotektive Konzentrationen an Prolin aufzubauen ist *B. subtilis* desweiteren in der Lage Di- und Oligopeptide in die Zelle zu transportieren, die Prolin beinhalten, welches durch Hydrolyse im Zytoplasma freigesetzt wird (Zaprasis *et al.*, 2013). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit eine Reihe von Aminosäuren in die Zelle aufzunehmen, welche in Prolin umgewandelt werden können (Zaprasis *et al.*, 2015).

3.7 Synthese des kompatiblen Soluts Prolin

Die Aminosäure Prolin spielt für *B. subtilis* eine wichtige Rolle und übernimmt verschiedenste Funktionen im Mikroorganismus. *B. subtilis* ist in der Lage auf Prolin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu wachsen (Moses *et al.*, 2012; Fischer, 1993). Als proteinogene Aminosäure erfüllt Prolin bei der Proteinbiosynthese eine essentielle Funktion. Unter hyperosmotischen Bedingungen dient Prolin als osmotische Schutzsubstanz (Bremer, 2002). Zu diesem Zweck kann Prolin entweder über den osmotisch induzierten Transporter OpuE aufgenommen oder *de novo* in der Zelle synthetisiert werden (Kempf und Bremer, 1998). Hierbei ist hervorzuheben, dass Prolin das einzige Osmoprotektivum darstellt, welches *de novo* von *B. subtilis* synthetisiert werden kann (Whatmore *et al.*, 1990). Wie in vielen anderen Mikroorganismen erfolgt die Prolinbiosynthese auch in *B. subtilis* ausgehend von Glutamat und involviert drei Enzyme: Die γ -Glutamyl-Kinase (ProB, ProJ), die γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase (ProA) und die Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase (ProI, ProH) (Abb. 2). In einem ersten Reaktionsschritt wird Glutamat ATP-abhängig durch die γ -Glutamyl-Kinase ProB phosphoryliert. Das daraus resultierende γ -Glutamyl-Phosphat wird in einem weiteren Schritt mit Hilfe der γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase ProA zu Glutamyl-5-Semialdehyd reduziert. Hierbei formen die Enzyme ProB und ProA einen Komplex, um die Freisetzung des instabilen Intermediates γ -Glutamyl-Phosphat in das Zytoplasma zu vermeiden. Glutamyl-5-Semialdehyd zyklisiert in einer spontanen Reaktion zu

Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat, welches durch die Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase Prol zum Endprodukt Prolin umgesetzt wird. Neben Prol konnte ein weiteres Enzym mit Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase-Aktivität in *B. subtilis* identifiziert werden (ProG) (Abb. 2). Die physiologische Rolle von ProG in der Prolinbiosynthese wurde bisher noch nicht geklärt (Belitsky *et al.*, 2001). Die erforderlichen Prolinmengen für die Verwendung als Baustein von Proteinen oder als osmotische Schutzsubstanz unterscheiden sich grundlegend.

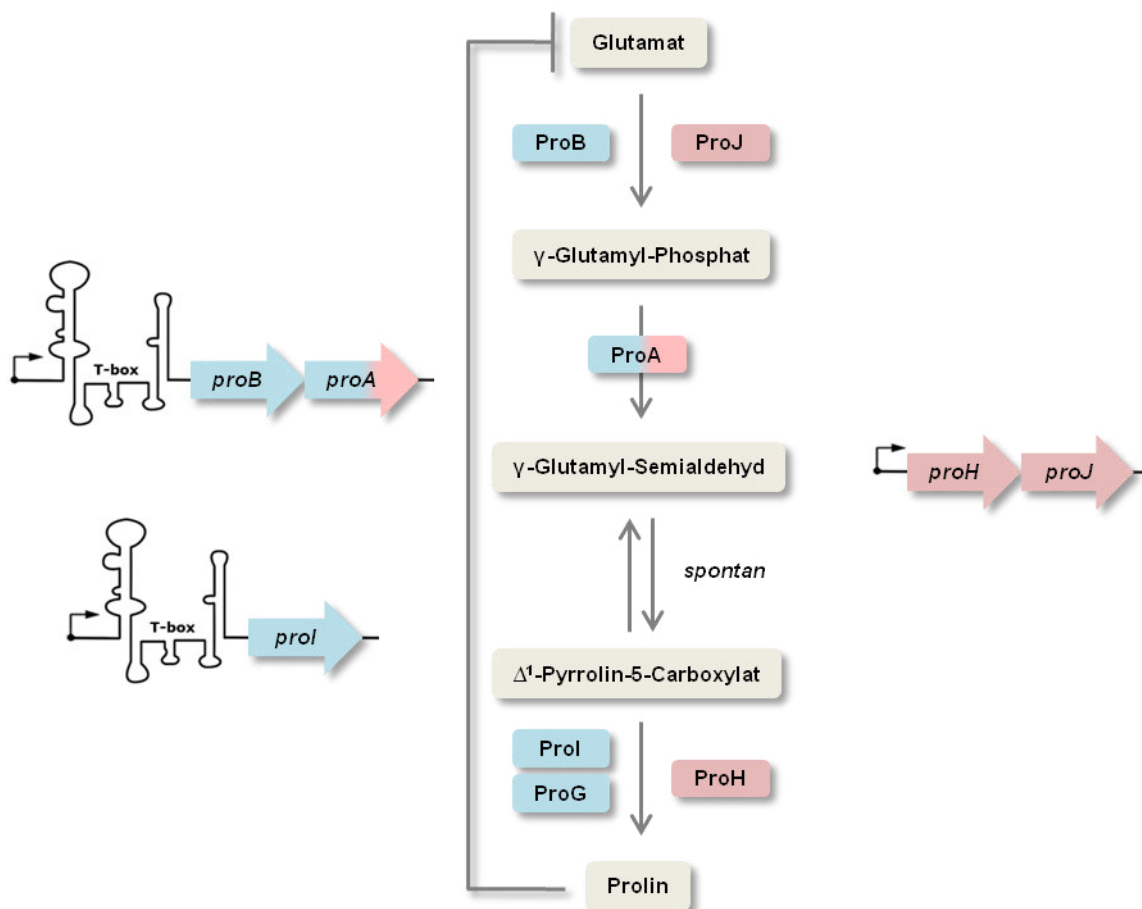


Abb. 2: Die zwei Wege der Prolinbiosynthese in *B. subtilis* und deren Regulation

Die Prolinbiosynthese in *B. subtilis* kann ausgehend von Glutamat über zwei Wege realisiert werden und involviert drei Enzyme: Die γ -Glutamyl-Kinase (ProB, ProJ), die γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase (ProA) und die Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase (Prol, ProG). Der anabole ProB-ProA-Prol-Weg (blau) wird zur Prolinproduktion für die Proteinbiosynthese genutzt. Der osmoadaptive ProJ-ProA-ProH-Weg (rot) dient der Bereitstellung großer Prolinmengen für den Einsatz als Osmostress-Schutzsubstanz. Beide Wege sind über die Enzymaktivität von ProA miteinander verbunden. Das *proBA*-Operon und das Gen *proI* sind auf transkriptioneller Ebene Prolin-abhängig über ein T-Box-regulatorisches System kontrolliert. Die Transkription des *proHJ*-Operons ist osmotisch induziert. Auf Proteinebene wird das ProB-Enzym zusätzlich durch Prolin allosterisch Feedback-reguliert (modifiziert nach Brill *et al.*, 2011).

Osmotisch nicht gestresste *B. subtilis*-Zellen weisen einen Prolinpool von rund 16 mM auf. Nach einem moderaten hyperosmotischen Schock von 400 mM NaCl steigt die interne Prolinkonzentration hingegen innerhalb von 7 Stunden auf 500 bis 700 mM an (Whatmore *et al.*, 1990). Um den unterschiedlichen Anforderungen für anabole und osmoadaptive Zwecke gerecht zu werden gibt es in *B. subtilis* neben der eben beschriebenen anabolen Prolinbiosynthese noch einen weiteren Weg, welcher die Bereitstellung osmoprotektiver Prolinmengen erlaubt (Brill *et al.*, 2011 b).

Der sogenannte osmoadaptive Prolinsyntheseweg schließt die Enzyme Enzyme ProJ, ProA und ProH ein (Brill *et al.*, 2011 b) (Abb. 2). Bei der γ -Glutamyl-Kinase ProJ und der Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase ProH handelt es sich um Isoenzyme von ProB und ProI aus dem anabolen Weg. Beide Routen für die Prolinbiosynthese sind über die Enzymaktivität der γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase ProA miteinander verbunden (Abb. 2).

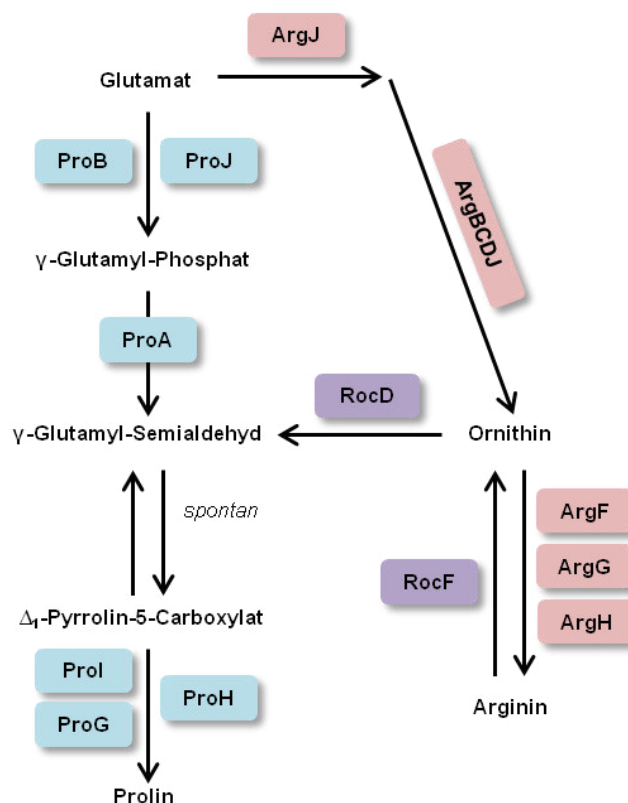


Abb. 3: Die Verknüpfung der Prolinbiosynthese und des Argininmetabolismus in *B. subtilis*

Die Prolinbiosynthese (blau) ausgehend von Glutamat wird durch die γ -Glutamyl-Kinase (ProB, ProJ), die γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase (ProA) und die Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase (ProI, ProG, ProH) katalysiert. Der Prolinbiosyntheseweg ist über die Ornithin-N-Acetyltransferase ArgJ mit dem Argininanabolismus (rot) und über die Ornithin-Aminotransferase RocD mit dem Argininkatabolismus (lila) vernetzt.

Die Prolinbiosynthese in *B. subtilis* ist eng mit dem Argininmetabolismus vernetzt. Eine Überschneidung des Prolinsyntheseweges und Argininanabolismus erfolgt über die Ornithin-N-Acetyltransferase ArgJ (Abb. 3). ArgJ ist Teil des *argCJBD-carAB-argF*-Operons, welches neben dem *argGH*-Operon für Gene der Argininbiosynthese codiert. Die Prolinbiosynthese und der Argininkatabolismus sind über die Ornithin-Aminotransferase RocD miteinander verbunden (Abb. 3). Prolin für anabole Zwecke wird hauptsächlich ausgehend von Glutamat mittels des ProB-ProA-Prol-Weges synthetisiert (Abb. 3). Darüber hinaus ist *B. subtilis* in der Lage über die Nutzung von Enzymen des Argininkatabolismus extrazelluläres Arginin, bzw. die verwandten Aminosäuren Ornithin oder Citrullin, als Prolinquelle zu nutzen. Die Prolinbiosynthese ausgehend von Arginin erfolgt über die Arginase RocF und der Ornithin-Aminotransferase RocD (Abb. 3). Beide Enzyme sind Teil des *rocDEF*-Operons, welches für Gene des Argininkatabolismus codiert, und ermöglichen die Umwandlung von Arginin (über Ornithin) zu γ -Glutamyl-Semialdehyd (Abb. 3).

3.8 Regulation der Prolinbiosynthese

Die Expression des *proBA*-Operons und des Genes *prol* in *B. subtilis* wird durch eine T-Box-abhängige transkriptionelle Antitermination reguliert (Chopin *et al.*, 1998) (Abb. 2). T-Box-Regulatoren sind weit verbreitet in Gram-positiven Bakterien und vermeiden eine Überproduktion und Überakkumulation von Aminosäuren (Green *et al.*, 2010; Gutiérrez-Preciado *et al.*, 2009; Vitreschak *et al.*, 2008; Wels *et al.*, 2008; Winkler, 2007). T-Box-Systeme sind RNA-basierte regulatorische Schalter (Henkin, 2008), welche die Expression von Genen, die für Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Enzyme der Aminosäure-Biosynthese oder Aminosäure-Transporter kodieren, regulieren (Green *et al.*, 2010; Gutiérrez-Preciado *et al.*, 2009; Winkler, 2007). T-Box-regulierte Gene weisen eine lange, hochstrukturierte und nicht-translatierte mRNA-Leaderregion auf, welche durch die Interaktion mit beladener bzw. unbeladener tRNA entweder eine Terminator- oder eine Antiterminator-Struktur ausbildet (Green *et al.*, 2010; Gutiérrez-Preciado *et al.*, 2009; Henkin, 2008; Vitreschak *et al.*, 2008; Wels *et al.*, 2008; Winkler, 2007). Die Expression T-Box-regulierter Gene wird durch den Mangel einer bestimmten Aminosäure induziert (Grandoni *et al.*, 1992; Henkin *et al.*, 1992; Putzer *et al.*, 1992),

im Falle von *proBA* und *proI* durch Prolin. Die jeweilige unbeladene tRNA agiert dabei als Effektor, der eine limitierte Verfügbarkeit einer spezifischen Aminosäure signalisiert (van de Guchte *et al.*, 2001; Condon *et al.*, 1996; Putzer *et al.*, 1995; Grundy *et al.*, 1994; Grundy und Henkin 1993). Im Falle eines Aminosäure-Mangels führen Interaktionen nicht beladener tRNA mit Elementen der mRNA-Leadersequenz zu einer Stabilisierung der Antiterminator-Struktur und erlauben die Transkription des T-Box-regulierten Genes (Green *et al.*, 2010; Gutiérrez-Preciado *et al.*, 2009). Wenn eine tRNA mit einer Aminosäure beladen ist finden diese Interaktionen hingegen nicht statt (Putzer *et al.*, 2002) und es bildet sich die energetisch günstigere Terminator-Konformation aus, welche zur Repression der Expression führt.

Auf Proteinebene ist der anabole Prolinbiosyntheseweg biochemisch durch die allosterische Feedback-Inhibition der γ -Glutamyl-Kinase ProB durch das Endprodukt Prolin reguliert (Chen *et al.*, 2007) (Abb. 2). Die Inhibition der durch ProB katalysierten enzymatischen Reaktion setzt schon bei sehr geringen Prolinmengen ein. Bereits Konzentrationen von 0,01 mM Prolin inhibieren das Enzym *in vitro* um 30 %. Konzentrationen von 0,1 mM Prolin und mehr führen zu einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität von ProB (Chen *et al.*, 2006).

Folglich ist der ProB-ProA-Prol-Weg aufgrund seiner transkriptionellen und posttranskriptionellen Kontrollsysteme stark an die Anforderungen der anabolen Proteinbiosynthese gebunden. Die verschwenderische und energetisch kostenintensive Überproduktion und Überakkumulation der Aminosäure Prolin wird hierbei unterbunden.

Die γ -Glutamyl-Kinase ProJ aus *B. subtilis* unterliegt offensichtlich keiner starken allosterischen Feedback-Inhibition durch Prolin, da ansonsten die angemessene Funktion im Zytoplasma osmotisch gestresster Zellen, welche sehr hohe Prolinmengen aufweisen, nicht realisiert werden könnte (Whatmore *et al.*, 1990). So zeigt die γ -Glutamyl-Kinase ProJ selbst in Gegenwart von 400 mM Prolin noch eine uneingeschränkte Enzymfunktion (Brill *et al.*, 2011 b).

Die Transkription des *proHJ*-Operons steht unter osmotischer Kontrolle. Hierbei wirken sowohl kontinuierlich hohe Salzkonzentrationen als auch der plötzliche Anstieg der externen Osmolarität induzierend (Brill *et al.*, 2011 b; Hahne *et al.*, 2010; Steil *et al.*, 2003). Die Transkription des *proHJ*-Operons nimmt mit steigender

Salzkonzentration linear zu. Die Expression des *proHJ*-Operons ist zum Teil durch die Anwesenheit des kompatiblen Solutes Glycin-Betain reprimiert (Brill *et al.*, 2011 b; Whatmore *et al.*, 1990). Das *proHJ*-Operon wird, anders als das *proBA*-Operon, nicht durch ein T-Box-regulatorisches System kontrolliert.

3.9 Struktur der γ -Glutamyl-Kinase

Die γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ sind Isoenzyme und katalysieren den ersten Schritt der Prolinbiosynthese in *B. subtilis*. Die dreidimensionale Struktur bakterieller γ -Glutamyl-Kinasen konnte bisher für *Escherichia coli* (Marco-Marin *et al.*, 2007) (Abb. 4 A), *Campylobacter jejuni* (Protein Date Bank [PDB] Code 2AKO) (Abb. 4 B) und *Burkholderia thailandensis* (PDB Code 2Q1T) geklärt werden.

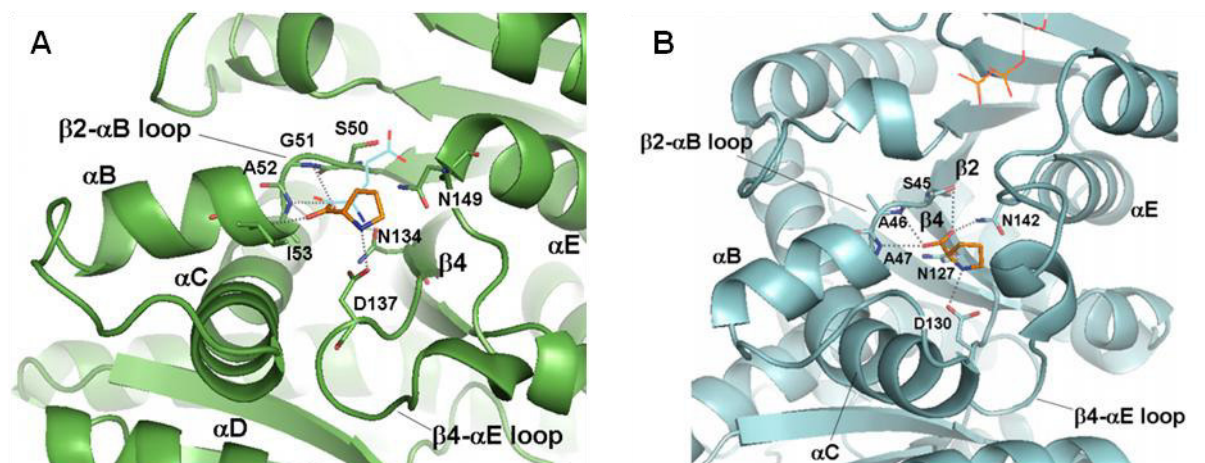


Abb. 4: Bindestelle von Prolin im aktiven Zentrum der γ -Glutamyl-Kinase aus *E. coli* und *C. jejuni*

Gezeigt ist die Prolin-Bindestelle für die Kristallstrukturen der γ -Glutamyl-Kinase 2J5V aus *E.coli* (A) und 2AKO aus *C. jejuni* (B). Wasserstoffbrücken-Bindungen sind als gestrichelte Linien eingezeichnet. Die wichtigsten Strukturelemente sind beschriftet. Die Proteine sind grün (A) und blau (B), der Inhibitor Prolin orange und das Substrat Glutamat blau dargestellt. Die Abbildungen wurden aus Perez-Arrelano *et al.* (2010 b) entnommen.

Die γ -Glutamyl-Kinase ProB aus *E. coli* ist hierbei das am besten untersuchte Enzym (Abb. 4 A). Sie bildet eine 367 Aminosäure-Reste lange Kette, welche sich in eine N-terminale Kinase-Domäne, die für die katalytische Reaktion und die Prolin-Inhibition verantwortlich ist, und eine C-terminale RNA-Bindedomäne unterscheiden lässt (Fichman *et al.*, 2015). Die

funktionelle Einheit des *E. coli*-Enzyms ist ein Tetramer bestehend aus zwei Dimeren (Perez-Arellano *et al.*, 2010 b). Die Bindestelle des Inhibitors Prolin und die des Substrates Glutamat überlappen teilweise im aktiven Zentrum des Enzyms (Perez-Arellano *et al.*, 2010 b) (Abb. 4). Die Bindung von Prolin und Glutamat an das Enzym ist durch einen 16 Aminosäuren langen flexiblen Loop moduliert, welcher das β -Faltblatt 4 und die α -Helix A miteinander verbindet (Perez-Arellano *et al.*, 2010 b) (Abb. 4). Der flexible Loop enthält viele konservierte Aminosäuren, die sowohl mit Glutamat als auch mit Prolin interagieren (Abb. 4). Untersuchungen haben gezeigt, dass der flexible Loop maßgeblich an der Feedback-Regulation der γ -Glutamyl-Kinase durch Prolin beteiligt ist. Das Glutamat an der Position 153 des Enzyms ist Teil dieses Loops. Ein Austausch dieses Aminosäure-Restes gegen die positiv geladene Aminosäure Lysin in der γ -Glutamyl-Kinase von *Lycopersicon esculentum* (Tomate) führt vergleichend zum Wildtyp zu einem 3500-fachen Absinken des K_i -Wertes für Prolin und zu einer 900-fachen Zunahme des intrazellulären Prolingehaltes (Fujita *et al.*, 2003). Ein Austausch dieser Aminosäure in *Listeria cytogenes* oder *E. coli* hat ebenfalls eine verminderte Feedback-Inhibition, sowie eine erhöhte Prolinakkumulation und einen Anstieg der osmotischen Toleranz zur Folge (Sleator *et al.*, 2001; Dandekar *et al.*, 1988). Dementsprechend scheint dieser Glutamat-Rest eine Schlüsselrolle in der Prolin-vermittelten Feedback-Inhibition sowohl von pflanzlichen als auch bakteriellen γ -Glutamylkinasen einzunehmen.

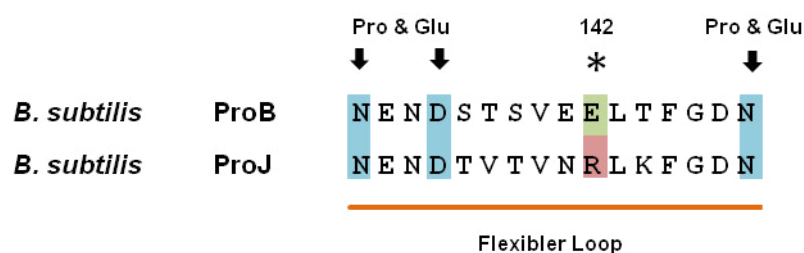


Abb. 5: Sequenzvergleich der γ -Glutamylkinasen ProB (Position 133 - 148) und ProJ aus *B. subtilis*

Gezeigt ist der Aminosäuresequenzvergleich des flexiblen Loops (orange markiert) der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aus *B. subtilis*. Der negative Aminosäurerest Glutamat an der Position 142 (E142) von ProB ist grün unterlegt. Der dieser Position entsprechende positive Aminosäurerest Arginin (R146) von ProJ ist rot unterlegt. Konservierte Aminosäuren im flexiblen Loop von ProB und ProJ, die mit dem Inhibitor Prolin und dem Substrat Glutamat interagieren, sind blau unterlegt.

Aufbauend auf diese Erkenntnisse konnte interessanterweise festgestellt werden, dass auch das durch Prolin Feedback-inhibierte Enzym ProB aus *B. subtilis* (Chen *et al.*, 2007) einen negativen Glutamat-Rest (E142) an der entsprechenden Position im flexiblen Loop aufweist, während das ProJ-Protein einen positiv geladenen Arginin-Rest (R146) an dieser Position zeigt (Abb. 5).

3.10 Zielsetzung

Die Prolinbiosynthese in *B. subtilis* kann über zwei Wege realisiert werden. Der anabole ProB-ProA-Prol-Weg wird zur Prolinproduktion für die Proteinbiosynthese genutzt. Der osmoadaptive ProJ-ProA-ProH-Weg dient der Bereitstellung großer Prolinmengen für den Einsatz als Osmostress-Schutzsubstanz. Die vorliegende Arbeit setzt sich mit folgenden Fragestellungen auseinander:

(1) Die γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ katalysieren den ersten Schritt der Prolinbiosynthese in *B. subtilis* und zeigen hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz einen signifikanten Unterschied im flexiblen Loop, welcher das β -Faltblatt 4 und die α -Helix A miteinander verbindet und für die Feedback-Regulation des Enzyms zuständig ist. Das allosterisch durch Prolin regulierte ProB-Enzym weist einen negativen Aminosäure-Rest an der Position 142 (E142) des Enzyms auf während das scheinbar nicht Feedback-regulierte ProJ einen positiven Aminosäure-Rest (R146) an der entsprechenden Position zeigt. Sind diese Aminosäure-Reste für Enzyme des ProB- und ProJ-Typs innerhalb der Gattung *Bacillus* konserviert? Welche Bedeutung besitzen diese Aminosäure-Reste im flexiblen Loop von ProB und ProJ in Hinblick auf die Feedback-Inhibition des Enzyms durch Prolin, die Fähigkeit zur Prolinakkumulation und die Salztoleranz osmotisch gestresster Zellen?

(2) Der anabole und der osmoadaptive Prolinbiosyntheseweg in *B. subtilis* sind über die γ -Glutamylphosphat-Reduktase ProA miteinander verbunden. Da kein paraloges Enzym existiert, führt der Verlust von ProA zu Störungen in der Prolinbiosynthese. In vorangegangenen Untersuchungen wurden bereits Suppressormutanten charakterisiert, welche in der Lage waren durch Punktmutationen über die Rekrutierung von Proteinen des Arginin-Abbauweges die anabole Prolinbiosynthese aufrecht zu erhalten. Diese Mutanten konnten jedoch keine osmoprotektiven Prolinlevel via *de novo*-Synthese aufbauen (Zaprasis *et al.*, 2014). Ist die Isolation

von Suppressormutanten möglich, welche auch die osmoadaptive Prolinbiosynthese bei Hyperosmolarität gewährleisten? Welchen Phänotyp zeigen diese Mutanten unter Hochsalzbedingungen? Welche Mutationen ermöglichen die Aufrechterhaltung der osmoadaptiven Prolinbiosynthese in Abwesenheit von ProA?

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen zu einem besseren Verständnis der Regulation der Prolinbiosynthese in *B. subtilis* beitragen.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Materialien

4.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Die verwendeten Reagenzien und Chemikalien, welche nicht gesondert im Text erwähnt werden, stammen von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), AppliChem (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Fluka (Buchs), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt). Die Bestandteile der Komplexmedien wurden von der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) bezogen. Die Antibiotika Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Tetrazyklin, Erythromycin, Lincomycin und Spectinomycin wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) und Zeocin wurde von Invitrogen (Carlsbad) erworben. Das TreA-Substrat p-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid (pNPG) und das Ninhydrin-Reagenz wurde von der Firma Sigma (Steinheim) bezogen. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen, Polymerasen, Ligasen und Phosphatasen stammen von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

4.1.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten bzw. konstruierten Stämme und Plasmide können den Tabellen 1, 2, 3, 4 und 5 entnommen werden. Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) synthetisiert und sind in der Tabelle 6 aufgelistet.

Tab. 1: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5 α	F- λ -E44 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 Φ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 hsdR17(rK ⁻ mK ⁺) <i>recA1 endA thi-1 relA1 gyrA96</i>	Hanahan, 1983
Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL str^R endA1 nupG</i>	Invitrogen (Darmstadt)
CSH26	Δ (<i>lac proBA gtp</i>)5 <i>thi ara</i>	L. Csonka

Tab. 2: Verwendete *B. subtilis*-Stämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
JH642	<i>trpC2 pheA1 appA</i> -168	BGSC 1A96 ¹
JSB8	$\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})1$	Brill <i>et al.</i> , 2011
GWB98	$\Delta(\textit{rocD}::\textit{aphA3})1$	Wünsche, 2010
GWB101	$\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})2$	Wünsche, 2010
GWB102	$\Delta(\textit{proBA}::\textit{tet})3$	Wünsche, 2010
GWB120	$\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})2$ (SigA-P1); Pro ⁺ -1	Wünsche, 2010
GWB128	$\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})2$ (RocR*:L250H); Pro ⁺ -9	Wünsche, 2010
ACB166	$\Delta(\textit{ahrC}::\textit{ery})1$	Zaprasis <i>et al.</i> , 2014
ACB212	$\Delta(\textit{treA}::\textit{zeo})3$	A. Zaprasis
ACB228	$\Delta(\textit{proB}::\textit{km})2$	A. Zaprasis
ACB238	$\Delta(\textit{proJ}::\textit{spc})$	A. Zaprasis
FSB1	$\Delta(\textit{treA}::\textit{km})1$	Spiegelhalter und Bremer, 1998
DE13	$\Delta(\textit{codY}::\textit{km}) \Delta(\textit{lacA}::\textit{ble}) \textit{amyE}::\phi[\Delta(\textit{PfrlB-lacZ})\textit{cmI}]$	B. R. Belitsky
BB1951	$\Delta(\textit{proG}::\textit{ble})$	Belitsky <i>et al.</i> , 2001

¹ BGSC: *Bacillus* Genetic Stock Center, Ohio, USA

Tab. 3: Konstruierte *B. subtilis*-Stämme

Stamm ⁴	Beschreibung ¹	Konstruktion ^{2,3}
DRB1	(ProB*:E142R)	LFH-PCR-Produkt → ACB228
DRB2	(ProB*:E142R) $\Delta(\textit{proHJ}::\textit{tet})1$	JSB8 → DRB1
DRB3	(ProJ*:R142E)	LFH-PCR-Produkt → ACB238
DRB4	$\Delta(\textit{proA}::\textit{ery})$	LFH-PCR-Produkt → JH642
DRB5	$\Delta(\textit{proBA}::\textit{cat})2 \Delta(\textit{ahrC}::\textit{ery})1$	ACB166 → GWB101

DRB6	$\Delta(proBA::cat)2 \Delta(ahrC::ery)1$ (SigA-P1)	ACB166 → GWB120
DRB7	$\Delta(proBA::cat)2 \Delta(ahrC::ery)1$ (RocR*:L250H)	ACB166 → GWB128
DRB8	$\Delta(T-Box_{proB}::ery)$	LFH-PCR-Produkt → ACB228
DRB9	$\Delta(T-Box_{proB}::ery)$ (ProB*:E142R)	LFH-PCR-Produkt → ACB228
DRB12	$\Delta(T-Box_{proB}::ery) \Delta(proHJ::tet)1$	JSB8 → DRB8
DRB13	$\Delta(T-Box_{proB}::ery)$ (ProB*:E142R) $\Delta(proHJ::tet)1$	JSB8 → DRB9
DRB16 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) (<i>argC</i> -P4); Pro ⁺ -20	Ausstrich von GWB120 Isolierung von Suppressormutante
DRB17 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) (AhrC*:L25Stop); Pro ⁺ -21	Ausstrich von GWB120 Isolierung von Suppressormutante
DRB18 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) (<i>argC</i> -P1); Pro ⁺ -22	Ausstrich von GWB120 Isolierung von Suppressormutante
DRB19 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) (<i>argC</i> -P2); Pro ⁺ -23	Ausstrich von GWB120 Isolierung von Suppressormutante
DRB20 ^b	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) (<i>argC</i> -P4); Pro ⁺ -24	Ausstrich von GWB120 Isolierung von Suppressormutante
DRB21 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) (<i>argC</i> -P4); Pro ⁺ -25	Ausstrich von GWB120 Isolierung von Suppressormutante
DRB22 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) (<i>argC</i> -P3); Pro ⁺ -26	Ausstrich von GWB120 Isolierung von Suppressormutante
DRB23 ^b	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) (<i>argC</i> -P3); Pro ⁺ -27	Ausstrich von GWB120 Isolierung von Suppressormutante
DRB24 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) (<i>argC</i> -P3); Pro ⁺ -28	Ausstrich von GWB120 Isolierung von Suppressormutante
DRB25 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) (<i>argC</i> -P3); Pro ⁺ -29	Ausstrich von GWB120 Isolierung von Suppressormutante
DRB26 ^b	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) (<i>argC</i> -P8); Pro ⁺ -30	Ausstrich von GWB120 Isolierung von Suppressormutante
DRB27 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) (<i>argC</i> -P3); Pro ⁺ -31	Ausstrich von GWB120 Isolierung von Suppressormutante
DRB28 ^b	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (<i>argC</i> -P4); Pro ⁺ -32	Ausstrich von GWB128 Isolierung von Suppressormutante
DRB29 ^b	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (<i>argC</i> -P5); Pro ⁺ -33	Ausstrich von GWB128 Isolierung von Suppressormutante
DRB30 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (AhrC*:T40K); Pro ⁺ -34	Ausstrich von GWB128 Isolierung von Suppressormutante
DRB31 ^b	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (AhrC*:Q38A); Pro ⁺ -35	Ausstrich von GWB128 Isolierung von Suppressormutante
DRB33 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (AhrC*:G101D); Pro ⁺ -36	Ausstrich von GWB128 Isolierung von Suppressormutante
DRB34 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (<i>argC</i> -P6); Pro ⁺ -37	Ausstrich von GWB128 Isolierung von Suppressormutante
DRB35 ^b	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (<i>argC</i> -P6); Pro ⁺ -38	Ausstrich von GWB128 Isolierung von Suppressormutante

DRB36 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (<i>argC</i> -P5); Pro ⁺ -39	Ausstrich von GWB128 Isolierung von Suppressormutante
DRB37 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (<i>argC</i> -P2); Pro ⁺ -40	Ausstrich von GWB128 Isolierung von Suppressormutante
DRB38 ⁵	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (<i>argC</i> -P2); Pro ⁺ -41	Ausstrich von GWB128 Isolierung von Suppressormutante
DRB39	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (AhrC*:G120Stop); Pro ⁺ -42	Ausstrich von GWB128 Isolierung von Suppressormutante
DRB40	$\Delta(proA::ery)$ (<i>argC</i> -P7); Pro ⁺ -43	Ausstrich von DRB4 Isolierung von Suppressormutante
DRB41	$\Delta(proA::ery)$ (<i>argC</i> -P8); Pro ⁺ -44	Ausstrich von DRB4 Isolierung von Suppressormutante
DRB42	$\Delta(proA::ery)$ (AhrC*:N143Stop); Pro ⁺ -45	Ausstrich von DRB4 Isolierung von Suppressormutante
DRB43	$\Delta(proA::ery)$ (AhrC*:A103D); Pro ⁺ -46	Ausstrich von DRB4 Isolierung von Suppressormutante
DRB45	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(codY::km)$	DE13 → ACB166
DRB46	$\Delta(treA::ery) \Delta(codY::km)$	DE13 → GNB37
DRB47	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(treA::km)$	GNB37 → ACB166
DRB48	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) (AhrC*:L25Stop) $\Delta(treA::km)1$	FSB1 → DRB17
DRB49	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (AhrC*:T40K) $\Delta(treA::km)1$	FSB1 → DRB30
DRB50	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (AhrC*:Q38A) $\Delta(treA::km)1$	FSB1 → DRB31
DRB51	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (AhrC*:G101D) $\Delta(treA::km)1$	FSB1 → DRB33
DRB52	$\Delta(proBA::cat)2$ (RocR*:L250H) (AhrC*:G120Stop) $\Delta(treA::km)1$	FSB1 → DRB39
DRB53	$\Delta(proA::ery)$ (AhrC*:N143Stop) $\Delta(treA::km)1$	FSB1 → DRB42
DRB54	$\Delta(proA::ery)$ (AhrC*:A103D) $\Delta(treA::km)1$	FSB1 → DRB43
DRB55	$\Delta(proBA::tet)3$ (SigA-P1) (AhrC*:L25Stop) $\Delta(treA::km)1$	GWB102 → DRB48
DRB56	$\Delta(proBA::tet)3$ (RocR*:L250H) (AhrC*:T40K) $\Delta(treA::km)1$	GWB102 → DRB49
DRB57	$\Delta(proBA::tet)3$ (RocR*:L250H) (AhrC*:Q38A) $\Delta(treA::km)1$	GWB102 → DRB50
DRB58	$\Delta(proBA::tet)3$ (RocR*:L250H) (AhrC*:G101D) $\Delta(treA::km)1$	GWB102 → DRB51
DRB59	$\Delta(proBA::tet)3$ (RocR*:L250H) (AhrC*:G120Stop) $\Delta(treA::km)1$	GWB102 → DRB52
DRB60	$\Delta(proBA::tet)3$ (AhrC*:N143Stop) $\Delta(treA::km)1$	GWB102 → DRB53
DRB61	$\Delta(proBA::tet)3$ (AhrC*:A103D) $\Delta(treA::km)1$	GWB102 → DRB54

DRB62	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(treA::km) amyE::\phi(argC_{Pro+23}-treA cat)$	pDST33 → DRB47
DRB63	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(treA::km) amyE::\phi(argC_{Pro+26}-treA cat)$	pDST34 → DRB47
DRB64	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(treA::km) amyE::\phi(argC_{Pro+45}-treA cat)$	pDST39 → DRB47
DRB65	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(treA::km) amyE::\phi(argC_{Pro+32}-treA cat)$	pDST35 → DRB47
DRB66	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(treA::km) amyE::\phi(argC_{Pro+39}-treA cat)$	pDST37 → DRB47
DRB67	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(treA::km) amyE::\phi(argC_{Pro+44}-treA cat)$	pDST38 → DRB47
DRB68	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(treA::km) amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → DRB47
DRB69	$\Delta(proBA::tet)3$ (SigA-P1) (AhrC*:L25Stop) $\Delta(treA::km)1 amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → DRB55
DRB70	$\Delta(proBA::tet)3$ (RocR*:L250H) (AhrC*:T40K) $\Delta(treA::km)1 amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → DRB56
DRB71	$\Delta(proBA::tet)3$ (RocR*:L250H) (AhrC*:Q38A) $\Delta(treA::km)1 amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → DRB57
DRB72	$\Delta(proBA::tet)3$ (RocR*:L250H) (AhrC*:G101D) $\Delta(treA::km)1 amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → DRB58
DRB73	$\Delta(proBA::tet)3$ (RocR*:L250H) (AhrC*:G120Stop) $\Delta(treA::km)1 amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → DRB59
DRB74	$\Delta(proA::ery)$ (AhrC*:N143Stop) $\Delta(treA::km)1$ $amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → DRB53
DRB75	$\Delta(proA::ery)$ (AhrC*:A103D) $\Delta(treA::km)1$ $amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → DRB54
DRB76	$\Delta(treA::ery)2 amyE::\phi(argC_{Pro+23}-treA cat)$	pDST33 → GNB37
DRB77	$\Delta(treA::ery)2 amyE::\phi(argC_{Pro+26}-treA cat)$	pDST34 → GNB37
DRB78	$\Delta(treA::ery)2 amyE::\phi(argC_{Pro+32}-treA cat)$	pDST35 → GNB37
DRB79	$\Delta(treA::ery)2 amyE::\phi(argC_{Pro+39}-treA cat)$	pDST37 → GNB37
DRB80	$\Delta(treA::ery)2 amyE::\phi(argC_{Pro+44}-treA cat)$	pDST38 → GNB37
DRB81	$\Delta(treA::ery)2 amyE::\phi(argC_{Pro+45}-treA cat)$	pDST39 → GNB37
DRB82	$\Delta(treA::ery)2 amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → GNB37
DRB83	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(codY::km) \Delta(treA::zeo)3$	ACB212 → DRB45
DRB86	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(codY::km) \Delta(treA::zeo)3$ $amyE::\phi(argC_{Pro+23}-treA cat)$	pDST33 → DRB83
DRB87	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(codY::km) \Delta(treA::zeo)3$ $amyE::\phi(argC_{Pro+26}-treA cat)$	pDST34 → DRB83
DRB88	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(codY::km) \Delta(treA::zeo)3$ $amyE::\phi(argC_{Pro+32}-treA cat)$	pDST35 → DRB83

DRB89	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(codY::km) \Delta(treA::zeo)3$ $amyE::\phi(argC_{Pro+39}-treA cat)$	pDST37 → DRB83
DRB90	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(codY::km) \Delta(treA::zeo)3$ $amyE::\phi(argC_{Pro+44}-treA cat)$	pDST38 → DRB83
DRB91	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(codY::km) \Delta(treA::zeo)3$ $amyE::\phi(argC_{Pro+45}-treA cat)$	pDST39 → DRB83
DRB92	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(codY::km) \Delta(treA::zeo)3$ $amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → DRB83
DRB99	$\Delta(treA::ery) \Delta(codY::km) amyE::\phi(argC_{Pro+23}-treA cat)$	pDST33 → DRB46
DRB100	$\Delta(treA::ery) \Delta(codY::km) amyE::\phi(argC_{Pro+26}-treA cat)$	pDST34 → DRB46
DRB101	$\Delta(treA::ery) \Delta(codY::km) amyE::\phi(argC_{Pro+32}-treA cat)$	pDST35 → DRB46
DRB102	$\Delta(treA::ery) \Delta(codY::km) amyE::\phi(argC_{Pro+39}-treA cat)$	pDST37 → DRB46
DRB103	$\Delta(treA::ery) \Delta(codY::km) amyE::\phi(argC_{Pro+44}-treA cat)$	pDST38 → DRB46
DRB104	$\Delta(treA::ery) \Delta(codY::km) amyE::\phi(argC_{Pro+45}-treA cat)$	pDST39 → DRB46
DRB105	$\Delta(treA::ery) \Delta(codY::km) amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → DRB46
DRB106	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(treA::km) amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → DRB47
DRB107	$\Delta(ahrC::ery) \Delta(codY::km) \Delta(treA::zeo)3$ $amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → DRB83
DRB108	$\Delta(treA::ery) \Delta(codY::km) amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → DRB46
DRB109	$\Delta(treA::ery)2 amyE::\phi(argC_{WT}-treA cat)$	pDST40 → DRB37
DRB110	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) ($argC-P^*$); Pro^+-20 $\Delta(proHJ::tet)1$	JSB8 → DRB16
DRB111	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) ($AhrC^*:L25Stop$); Pro^+-21 $\Delta(proHJ::tet)1$	JSB8 → DRB17
DRB112	$\Delta(proBA::cat)2$ ($RocR^*:L250H$) ($argC-P^*$); Pro^+-32 $\Delta(proHJ::tet)1$	JSB8 → DRB28
DRB113	$\Delta(proBA::cat)2$ ($RocR^*:L250H$) ($AhrC^*:T40K$); Pro^+-34 $\Delta(proHJ::tet)1$	JSB8 → DRB30
DRB114	$\Delta(proA::ery) (argC-P^*)$; Pro^+-44 $\Delta(proHJ::tet)1$	JSB8 → DRB40
DRB115	$\Delta(proA::ery) (AhrC^*:N143Stop)$; Pro^+-46 $\Delta(proHJ::tet)1$	JSB8 → DRB42
DRB116	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) ($argC-P^*$); Pro^+-20 $\Delta(proHJ::tet)1 \Delta(proG::ble)$	BB1951 → DRB110
DRB117	$\Delta(proBA::cat)2$ (SigA-P1) ($AhrC^*:L25Stop$); Pro^+-21 $\Delta(proHJ::tet)1 \Delta(proG::ble)$	BB1951 → DRB111

¹ Die Bezeichnung $amyE::\phi(argC-treA cat)$ kennzeichnet, dass die $argC-treA$ -Genfusion mittels doppelter Rekombination stabil in das $amyE$ -Gen von *B. subtilis* integriert wurde.

² Die Konstruktion der Stämme ist stichpunktartig in der letzten Spalte aufgeführt. Dabei bedeutet ein „→“, dass der hinter dem Pfeil genannte Stamm mit chromosomaler DNA des ersten Stammes, einem Plasmid oder einem PCR-Fragment transformiert wurde.

³ Die mit „LHF-PCR“ gekennzeichneten Stämme wurden mittels *Long Flanking Homology* PCR (Kuwayama *et al.*, 2002; Wach, 1996) konstruiert.

⁴ Alle aufgeführten Stämme sind Derivate des *B. subtilis* Wildtypstammes JH642 und tragen daher zusätzlich zu den genannten Genotypen die *trpC2 pheA1* Mutationen.

⁵ Die Prolin-prototrophen Pro⁺-Suppressor-Stämme wurden nach ihrer Isolierung mit Nummern versehen (Pro⁺-20 bis Pro⁺-47).

Tab. 4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBluescript II KS+	High Copy Vektor; Multiple Cloning Site; Ampicillin-Resistenzkassette	Alting-Mees und Short, 1989
pPink	Low Copy Vektor; trägt promotorloses <i>treA</i> Reportergen und homologe Bereiche des <i>amyE</i> Genlocus zur stabilen Genomintegration in <i>B. subtilis</i> ; Ampicillin- und Chloramphenicol-Resistenzkassette; optimierte <i>BamHI</i> - <i>SmaI</i> -Schnittstelle	Löbach, 2016

Tab. 5: Konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pDST16	Das <i>proBA</i> -Opreron von JH642 wurde mit den Primern <i>proBA_fw_KpnI</i> und <i>proBA_rev_BamHI</i> durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen <i>KpnI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pBluescript KS+ ligiert	Diese Arbeit
pDST17	Das mutierte <i>proBA</i> -Opreron von DRB1 wurde mit den Primern <i>proBA_fw_KpnI</i> und <i>proBA_rev_BamHI</i> durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen <i>KpnI</i> und <i>BamHI</i> in den Vektor pBluescript KS+ ligiert	Diese Arbeit
pDST32	Die <i>argC</i> -Promotorregion von DRB18 wurde mit den Primern <i>ahrC_treA_fw</i> und <i>ahrC_treA_rev</i> durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>SmaI</i> in den Vektor pSL31 ligiert.	Diese Arbeit
pDST33	Die <i>argC</i> -Promotorregion von DRB19 wurde mit den Primern <i>ahrC_treA_fw</i> und <i>ahrC_treA_rev</i> durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>SmaI</i> in den Vektor pSL31 ligiert.	Diese Arbeit
pDST34	Die <i>argC</i> -Promotorregion von DRB22 wurde mit den Primern <i>ahrC_treA_fw</i> und <i>ahrC_treA_rev</i> durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>SmaI</i> in den Vektor pSL31 ligiert.	Diese Arbeit
pDST35	Die <i>argC</i> -Promotorregion von DRB28 wurde mit den Primern <i>ahrC_treA_fw</i> und <i>ahrC_treA_rev</i> durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>SmaI</i> in den Vektor pSL31 ligiert.	Diese Arbeit

pDST36	Die <i>argC</i> -Promotorregion von DRB29 wurde mit den Primern <i>ahrC_treA_fw</i> und <i>ahrC_treA_rev</i> durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Sma</i> I in den Vektor pSL31 ligiert.	Diese Arbeit
pDST37	Die <i>argC</i> -Promotorregion von DRB34 wurde mit den Primern <i>ahrC_treA_fw</i> und <i>ahrC_treA_rev</i> durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Sma</i> I in den Vektor pSL31 ligiert.	Diese Arbeit
pDST38	Die <i>argC</i> -Promotorregion von DRB40 wurde mit den Primern <i>ahrC_treA_fw</i> und <i>ahrC_treA_rev</i> durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Sma</i> I in den Vektor pSL31 ligiert.	Diese Arbeit
pDST39	Die <i>argC</i> -Promotorregion von DRB41 wurde mit den Primern <i>ahrC_treA_fw</i> und <i>ahrC_treA_rev</i> durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Sma</i> I in den Vektor pSL31 ligiert.	Diese Arbeit
pDST40	Die <i>argC</i> -Promotorregion von JH642 wurde mit den Primern <i>ahrC_treA_fw</i> und <i>ahrC_treA_rev</i> durch PCR amplifiziert und über die Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Sma</i> I in den Vektor pSL31 ligiert.	Diese Arbeit

Tab. 6: Oligonukleotide

Name	Bezeichnung	Sequenz ¹	Bemerkung ^{2,3}
DS1	ProB*_zeo_P1	AAACGGATCTTCTTTATCGCGTTGATTTTA	LHF-PCR (5'-Flanke) ProB*-Mutante
DS2	proB*_ery_P2	TTGATATTTAAATTTATTAGGATCCCCGGGT CTTGCACTCTAGTTAAAGACGATTGTTTT	LHF-PCR (5'-Flanke) ProB*-Mutante
DS3	ProB*_ery_P2rev	AAAACAATCGTCTTTAACTAGACTGCAAGA CCCGGGGATCCTAATAAATTTAAATATCAA	LHF-PCR (Ery ^R) ProB*-Mutante
DS4	ProB*_ery_P3	TCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTAT GGCTATTTTTGATGACAAAAACCTTGACA	LHF-PCR (Ery ^H) ProB*-Mutante
DS5	ProB*_ery_P3rev	TGTCAAGGTTTTTTGTGCATCAAAAATAGCC ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGA	LHF-PCR (3'-Flanke) ProB*-Mutante
DS6	ProB*_zeo_P4	AATCAATACGTCTAAGCCATCATTTAACGT	LHF-PCR (3'-Flanke) ProB*-Mutante
DS7	ProJ*_zeo_P1	AATACAGAGCGATTAAGTGAAGTTGAAGTT	LHF-PCR (5'-Flanke) ProJ*-Mutante
DS8	proJ*_ery_P2	TTGATATTTAAATTTATTAGGATCCCCGGG CTTCTATATAGAAGCTTCGGGTTTTTTTCT	LHF-PCR (5'-Flanke) ProJ*-Mutante
DS9	ProJ*_ery_P2rev	AGAAAAAACCCTGAAGCTTCTATATAGAAG CCCGGGGATCCTAATAAATTTAAATATCAA	LHF-PCR (Ery ^R) ProJ*-Mutante
DS10	proJ*_ery_P3	TCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTAT GGTTTCATTTTTTTTATTGATACTGCTCCA	LHF-PCR (Ery ^R) ProJ*-Mutante
DS11	ProJ*_ery_P3rev	TGGAGCAGTATCAATAAAAAAATGAACCC ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGA	LHF-PCR (3'-Flanke) ProJ*-Mutante
DS12	ProJ*_zeo_P4	TTTCCGATAATACCGGTCATAAAATCTAAC	LHF-PCR (3'-Flanke) ProJ*-Mutante

DS13	proA_P1	GAATAGTAGTGAAAATAGGAAGCAGTTCGC	LHF-PCR (5'-Flanke) ProA-Deletions-Mutante
DS14	proaA_P2	TTGATATTTAAATTTATTAGGATCCCCGGG CATTCTCTTTTCCGTTACAATGTCTTTTG	LHF-PCR (5'-Flanke) ProA-Deletions-Mutante
DS15	proA_P3	CAAAAGACATTGTGAACGGAAGAGAATG CCCGGGGATCCTAATAAATTTAAATATCAA	LHF-PCR (Ery ^R) ProA-Deletions-Mutante
DS16	proA_P4	GATGTATTTTGTAGAAGTCAGTGCAGGAAG ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGA	LHF-PCR (Ery ^R) ProA-Deletions-Mutante
DS17	proA_P5	TCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATC TTCCTGCACTGACTTCTACAAATACATC	LHF-PCR (3'-Flanke) ProA-Deletions-Mutante
DS18	proA_P6	GGAGAATCAGCTTTGTTTTTGTATATGC	LHF-PCR (3'-Flanke) ProA-Deletions-Mutante
DS19	t_box_P1	AAACGGATCTTCTTTATCGCGTTGATTTTA	LHF-PCR (5'-Flanke) T-Box-Deletions-Mutante
DS20	t_box_P2	AAAAACCCATTTTCATCCTGATTCATAAGGA TACTAATCCTCTTCAACGCTCAATGATTTT	LHF-PCR (5'-Flanke) T-Box-Deletions-Mutante
DS21	t_box_P3	AAAATCATTGAGCGTTGAAGAGGATTAGTA TCCTTATGAATCAGGATGAAATGGGTTTTT	LHF-PCR (3'-Flanke) T-Box-Deletions-Mutante
DS22	t_box_P4	AATCAATACGTCTAAGCCATCATTTAACGT	LHF-PCR (3'-Flanke) T-Box-Deletions-Mutante
DS23	ahrC_fw	TGCGCGTTGTAGAAGAAGCA	Sequenzierung <i>ahrC</i> -Region Suppressormutanten
DS24	ahrC_rev	GCCCGCGTTCAAAAGAAACC	Sequenzierung <i>ahrC</i> -Region Suppressormutanten
DS25	argC_fw	CCATTATGCTCGGGGGCTTT	Sequenzierung <i>argC</i> -Region Suppressormutanten
DS26	argC_rev	AACCGTAATTCCCGCGTCTG	Sequenzierung <i>argC</i> -Region Suppressormutanten
DS27	ahrC_treA_fw	ATT <u>GGGCCC</u> GAGTGGATTGATGATGATGA	Klonierung des <i>argC</i> - Promotorfragmentes in pSL31
DS28	ahrC_treA_rev	ATT <u>GGATCCT</u> CGTATTCATATCAATCGGC	Klonierung des <i>argC</i> - Promotorfragmentes in pSL31
DS29	proBA_fw_KpnI	ATT <u>GGTACC</u> GGGTTTTTTTATTGTAGAAGA GCCGC	Klonierung des <i>proBA</i> - Operons in pBluescript II KS+
DS30	proBA_rev_BamHI	ATT <u>GGATCC</u> GCTTTTTTCATTGAACATTACC CCGC	Klonierung des <i>proBA</i> - Operons in pBluescript II KS+
	pJMB1- pFSB1_Seq_for	ATAAGGGTAACTATTGCCG	Allgemeine Sequenzierprimer für pJMB1
	pJMB1_Seq_rev	ACCATTTCTGTCTGATCG	Allgemeine Sequenzierprimer für pJMB1
	M13 rev (-49)	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	Allgemeine Sequenzierprimer
	M13 uni (-43)	AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT	Allgemeine Sequenzierprimer

¹ Die angefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

² LHF-PCR steht für *Long Flanking Homology* PCR (Kuwayama *et al.*, 2002; Wach, 1996)

³ Ery^R steht für Erythromycin-Resistenz

4.1.3 Medien

Medien, Lösungen und Puffer wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert (121°C, 20 min, 2 bar). Thermolabile Substanzen wie Antibiotika und Aminosäuren wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm; Sarstedt, Nümbrecht). Glasgeräte wurden 3 h bei 180°C trocken sterilisiert. Für die Herstellung von Festmedien erfolgte vor dem Autoklavieren die Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar-Agar. Zur Identifikation von LacZ⁺-Kolonien auf Agarplatten wurde X-Gal (40 µg/ml) zum Medium gegeben.

Vollmedium für *B. subtilis* und *E. coli*

LB-Medium (*Luria Bertani Broth*) (Miller, 1992; Sambrook *et al.*, 1989)

Trypton		10	g
Hefeextrakt		5	g
NaCl		10	g
dH ₂ O	<i>ad</i>	1000	ml

Minimalmedium für *B. subtilis*

Für die Kultivierung von *B. subtilis* wurde SMM mit zusätzlichen Spurenelementen verwendet. Als Kohlenstoffquelle wurde 0,5 % Glukose (w/v) zugefügt. Zur Komplementation der zwei Auxotrophien des Stammes JH642 und seiner Derivate (trpC2 pheA1) enthielt das Medium L-Tryptophan (20 mg/l) und L-Phenylalanin (18 mg/l). Für Untersuchungen unter hochosmolaren Bedingungen wurde das Medium mit der gewünschten Konzentration NaCl (5 M Stammlösung) versetzt.

5 x SMM (Spizizen's Minimal Medium) (Harwood und Archibald, 1990)

(NH ₄) ₂ SO ₄		10	g
K ₂ HPO ₄		70	g
KH ₂ PO ₄		30	g
Na ₃ Citrat x 2H ₂ O		15	g
MgSO ₄ x 7H ₂ O		11	g
dH ₂ O	<i>ad</i>	1000	ml

100 x Spurenelemente (Harwood und Cutting, 1990)

CaCl ₂	0,55	g
FeCl ₃ x 6H ₂ O	1,35	g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,10	g
ZnCl ₂	0,17	g
CuCl ₂ x 6H ₂ O	0,05	g
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,06	g
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,06	g
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000	ml

Minimalmedium für *E. coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde M63-Medium mit 10 mM Glukose (w/v) als Kohlenstoffquelle verwendet. Desweiteren enthielt das Medium 0,1 mM Thiamin, 1 mM MgSO₄ und eine Mischung aller proteinogenen Aminosäuren außer Prolin in einer Konzentration von jeweils 0,2 mM. Der pH-Wert des Mediums wurde mittels KOH auf 7 eingestellt.

5 x M63-Medium (Cohen und Rickenberg, 1956)

(NH ₄) ₂ SO ₄	10	g
KH ₂ PO ₄	68	g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	2,5	mg
dH ₂ O	<i>ad</i> 1000	ml

4.1.4 Medienzusätze**Antibiotika**

Selektivmedien enthielten je nach Bedarf verschiedene Antibiotika. Diese wurden als konzentrierte Stammlösungen entweder in destilliertem Wasser oder 70 % Ethanol angesetzt und sterilfiltriert. Nach Abkühlung der autoklavierten Medien bis auf 50°C wurden die Antibiotika in der entsprechenden Endkonzentration zugegeben. Die in Tabelle 7 angegebenen Antibiotikakonzentration wurden sowohl in Fest- als auch in Flüssigmedien eingesetzt.

Tab. 7: Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Endkonzentration	Endkonzentration
		<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Ampicillin	dH ₂ O	-	100 µg/ml
Kanamycin	dH ₂ O	5 µg/ml	-
Tetracyclin	70 % Ethanol	10 µg/ml	-
Erythromycin ¹	70 % Ethanol	0,5 µg/ml	-
Lincomycin ¹	70 % Ethanol	15 µg/ml	-
Spectinomycin	dH ₂ O	100 µg/ml	-
Chloramphenicol	70 % Ethanol	5 µg/ml	-
Zeocin	dH ₂ O	70 µg/ml	-

¹ Für die Selektion auf eine Erythromycin-Resistenz wurde ein Gemisch auf Erythromycin und Lincomycin in den oben genannten Konzentrationen eingesetzt.

Aminosäuren

Die Aminosäuren L-Prolin und L-Arginin wurden als Stammlösungen in destilliertem Wasser angesetzt. Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert, bei 4°C gelagert und entsprechend ihrer Enkonzentrationen zu den Medien gegeben. Die Konzentration von L-Prolin betrug 10 mM in Festmedien und 1 mM in Flüssigmedien. Die Konzentration von L-Arginin in Flüssigmedien betrug ebenfalls 1 mM. Zur Anzucht der Zellen für die TreA-Aktivitäts-Assays (4.4.4) wurden 20 mM L-Arginin im Flüssigmedium eingesetzt.

4.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.1 Wachstumsbedingungen

Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Inkubation von Bakterienkulturen aerob bei einer Temperatur von 37°C. Kleinere Volumina von bis zu 5 ml wurden im Reagenzglas auf einem Roller inkubiert. Größere Volumina wurden im Erlenmeyerkolben im Wasserbad oder im Luftschüttler bei 220 rpm inkubiert. Die Inkubation von Agarplatten erfolgte im Brutschrank.

4.2.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte einer Bakterienkultur erfolgte photometrisch durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm. Das nicht beimpfte Wachstumsmedium diente als Blindwert. Für Bakteriensuspensionen mit einer OD₅₇₈ größer als 0,5 erfolgte eine entsprechende Verdünnung. Eine OD₅₇₈ von 1 entspricht ca. 1×10^9 Zellen/ml (Sambrook *et al.*, 1989).

4.2.3 Bestimmung von Mutationsraten

Für die Bestimmung der Mutationsrate der Bildung von *proBA*-Suppressoren unter osmotischen Bedingungen wurden die Stämme GWB120 ($\Delta proBA$, *rocDEF**), GWB128 ($\Delta proBA$, *rocR**) sowie DRB4 ($\Delta proA$) in SMM-Medium mit 10 mM Prolin und 0,8 M NaCl bis zur stationären Phase angezogen. Anschließend wurden die Kulturen zweimal mit SMM-Medium + 0,8 M NaCl gewaschen, um das im Medium befindliche Prolin vollständig zu entfernen. Die gewaschenen Kulturen wurden seriell in SMM-Medium + 0,8 M NaCl verdünnt. Von jeder dieser Verdünnungsstufen wurden schließlich 100 µl auf SMM-Agarplatten mit 0,8 M NaCl bzw. auf SMM-Agarplatten mit 0,8 M NaCl und 10 mM Prolin ausplattiert und für 3 Tage bei 37°C inkubiert. Die auf den Platten gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und die Mutationsrate (MR) der *proBA*-Suppression nach folgender Formel errechnet:

$$MR = \frac{SZZ}{LZZ} = \frac{(n_{SMM+NaCl} * Vf * 10)}{(n_{SMM+NaCl+Pro} * Vf * 10)}$$

SZZ : Suppressorzellzahl

LZZ : Lebendzellzahl

$n_{SMM+NaCl}$: Anzahl der Kolonien auf SMM-NaCl-Agarplatten

$n_{SMM+NaCl+Pro}$: Anzahl der Kolonien auf SMM-NaCl-Pro-Agarplatten

Vf : Verdünnungsfaktor der ausgezählten Verdünnungsstufe

4.3 Molekularbiologische und genetische Methoden

4.3.1 Präparation und Nachweis von DNA

Isolierung von chromosomaler DNA aus *B. subtilis*

Die Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis* erfolgte nach der Methode von Marmur (1961). Zunächst wurden 5 ml einer 5 Stunden gewachsenen *B. subtilis*-Kultur zentrifugiert (10 min, 5000 g). Das Pellet wurde in 500 µl Saline-EDTA (pH 8) resuspendiert, mit 50 µl Lysozym (50 mg/ml) versetzt und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 62 µl einer 20%-igen SDS-Lösung erfolgte für 10 min eine Inkubation bei 60°C. Das klare Lysat wurde mit 120 µl Na-Perchlorat und 800 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt, 30 min bei Raumtemperatur unter starkem Schütteln inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 13000 g). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, um die darin befindlichen Nukleinsäuren mittels Ethanol zu fällen (Sambrook *et al.*, 1989). Das Pellet wurde schließlich in 100 µl dH₂O resuspendiert.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmiden im kleinen Maßstab erfolgte aus 5 ml LB-Kulturen mit Hilfe des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits (Thermo Scientific, Langenselbold). Plasmid-Präparationen im großen Maßstab wurden unter Verwendung des Plasmid Midi Kits (Qiagen GmbH, Hilden) durchgeführt. Die Arbeiten mit beiden Kits erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers.

Quantifizierung und Reinheitskontrolle von DNA

Die Bestimmung der Konzentration und Qualität von DNA erfolgte über eine spektrophotometrische Messung mit dem Nanodrop (Nanodrop® ND-10.000, PeqLab, Erlangen). Zu diesem Zweck wurde die Absorption bei 260 nm, 280 nm und 230 nm sowie die Koeffizienten A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} bestimmt. Es gilt die Annahme, dass bei einer OD₂₆₀ von 1 ungefähr 50 µg/ml doppelsträngige DNA vorliegen. Der Koeffizient A_{260}/A_{280} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte außerhalb dieser

Vorgabe deuten auf Verunreinigungen der DNA mit Proteinen hin. Der Koeffizient A_{260}/A_{230} sollte unter 2,0 liegen. Größere Werte sind Hinweis auf eine Kontamination der DNA mit Phenol oder anderen organischen Verbindungen (Sambrook *et al.*, 1989).

Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurde ein 1 %-iges Agarosegel in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) verwendet. Die Nukleinsäuren wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 6 x Loading Dye versetzt. Zur Auftrennung der Proben wurde eine Spannung von 120 V an die Elektrophoresekammer angelegt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde die im Agarosegel aufgetrennte DNA in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) angefärbt, unter UV-Licht visualisiert und mit einer Dokumentationsanlage (Gel Jet Imager, INTAS GmbH, Göttingen) fotografiert. Als Größenstandard wurde der DNA-Marker MassRuler™ DNA Ladder Mix verwendet.

Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden von der Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Sequenzen wurden mit dem Software Mega 5.05 analysiert (Tamura *et al.*, 2011).

Restriktion, Dephosphorylierung und Ligation von DNA

Die Restriktion von Plasmiden und PCR-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten am 5'-Ende wurde mit der Alkalinen Phosphatase (FastAP) durchgeführt. Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit der T4-DNA-Ligase. Die eingesetzten Enzym- und DNA-Mengen, die Auswahl des Puffers, sowie die Reaktionszeiten und Reaktionstemperaturen entsprachen den Angaben des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Rot).

Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur selektiven Amplifikation von DNA (Saiki *et al.*, 1988). Die Durchführung erfolgte nach Standardprotokollen (White, 1993) unter Verwendung der Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot). Als Matritzen-DNA diente chromosomale DNA oder Plasmid-DNA. Der Reaktionsansatz (50 µl) setzte sich aus 31,5 µl dH₂O; 10 µl 5 x Phusion® HF-Puffer; 1 µl 10 mM dNTPs; 2,5 µl Vorwärtsprimer (10 pmol); 2,5 µl Rückwärtsprimer (10 pmol); 2 µl Matritzen-DNA (200 - 300 ng) und 0,5 µl Phusion DNA-Polymerase zusammen. Die PCR-Reaktion wurde im Trio Thermoblock-Cycler (Biometra, Göttingen) mit folgendem Programm (Tab. 8) durchgeführt:

Tab. 8: PCR-Cycler-Programm für Standard-PCR

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen
Anfangsdenaturierung	98°C	30 s	1
Denaturierung	98°C	10 s	30
Annealing	T _m + 3°C	30 s	
Elongation	72°C	15 - 30 s/ kB	
Endelongation	72°C	5 min	1

Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die im Agarosegel lediglich eine einzelne Bande aufwiesen, wurden mit dem PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

PCR-Produkte, die hingegen mehrere Banden zeigten, wurden vollständig auf das Agarosegel aufgetragen, mit einem Skalpell die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des Gel Extraction Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

4.3.2 Transformation von Bakterien

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der CaCl_2 -Methode (Sambrook und Russel, 2001). Hierbei wurde eine 250 ml LB-Kultur aus einer über Nacht gewachsenen 5 ml LB-Vorkultur auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft und bei 37°C und 220 rpm im Luftschüttler inkubiert. Bei einer OD_{578} von 0,4 wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C zentrifugiert (10 min, 5000 rpm). Das Zellpellet wurde in 15 ml eiskaltem 0,1 M CaCl_2 resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und erneut bei 4°C zentrifugiert (10 min, 5000 rpm). Das Zellpellet wurde in 4 ml eiskaltem 0,1 M CaCl_2 mit 15 % Glycerol resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert und mittels Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Kompetenten Zellen erfolgte bei - 80 °C.

Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurden 10 min auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit der zu transformierenden Plasmid-DNA gemischt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42°C. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis von 5 min wurde der Transformationsansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 60 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Die Selektion von Transformanten erfolgte auf LB-Festmedium, welches mit Antibiotika versetzt war.

Herstellung natürlich kompetenter *B. subtilis*-Zellen

Im Gegensatz zu *E. coli* verfügt *B. subtilis* über eine natürliche Kompetenz und kann folglich ohne vorherige chemische oder physikalische Behandlung DNA aus der Umgebung in das Zellinnere aufnehmen und in das Genom zu integrieren. Für die Vorbereitung natürlich kompetenter Zellen wurde die Methode von Cutting und Van Horn (1990) angewendet. Von einer frisch ausgestrichenen LB-Agarplatte des zu transformierenden Stammes wurden 3 ml 1 x SMM angeimpft und über Nacht bei 37°C im Roller inkubiert. Aus der Übernachtskultur wurden schließlich 20 ml

vorgewärmtes LS-Medium angeimpft und bei 37°C und 220 rpm im Wasserbad inkubiert. Nach ca. 3 Stunden befanden sich die Zellen am Beginn der stationären Phase und waren in der Lage für kurze Zeit DNA aufzunehmen.

Transformation natürlich kompetenter *B. subtilis*-Zellen

Für die Transformation natürlich kompetenter *B. subtilis*-Zellen wurden 1 ml des LS-Mediums (siehe „Herstellung natürlich kompetenter *B. subtilis*-Zellen“) und 10 µg DNA gemischt und für 2 h bei 37°C im Roller inkubiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung potentieller Transformaden erfolgte in zwei Schritten auf Antibiotika-Platten. Zudem wurde auf das Vorhandensein ursprünglicher Resistenzen geprüft.

LS-Medium (Low Salt-Medium)

10 x S-Base	2	ml
20 % (w/v) Glukose	0,5	ml
L-Tryptophan (5 µg/ml)	30	µl
L-Phenylalanin (3 µg/ml)	40	µl
2 % (w/v) Casein-Hydrolysat	10	µl
10 % (w/v) Hefeextrakt	0,2	ml
50 mM Spermin	0,2	ml
1 M MgCl ₂	50	µl
dH ₂ O	17	ml

10 x S-Base

(NH ₄) ₂ SO ₄	2	g
K ₂ HPO ₄	14	g
KH ₂ PO ₄	6	g
Na ₃ -Citrat x 2H ₂ O	1	g
dH ₂ O	<i>ad</i> 100	ml

4.3.3 Konstruktion von Plasmiden und Bakterienstämmen

Das Plasmid pJMB1

Das Plasmid pJMB1 (Jebbar und Bremer, unveröffentlichte Daten) ist ein Derivat des Vektors pMD476 (Schröck *et al.*, 1996), dessen Replikationsursprung durch den des Vektors pACY177 (Chang und Cohen, 1978) ersetzt wurde. Das Plasmid erlaubt die Herstellung von Reportergenfusionen in *B. subtilis*. Das Reportergen *treA* aus *B. subtilis* codiert für eine salztolerante Phospho- α -(1,1)-Glukosidase (Gotsche und Dahl, 1995; Helfert, 1995). Der Vektor pJMB1 besitzt eine *Multiple Cloning Site* (MCS), in die mit Hilfe von Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sma*I Promotorfragmente integriert werden können. In dieser Arbeit wurde mit dem Plasmid pPink (Löbach, 2016) ein Derivat des pJMB1 genutzt. Durch das Einfügen eines 2 bp Spacers konnte hier das Überlappen der Erkennungssequenzen von *Bam*HI und *Sma*I verhindert werden, was die Linearisierung des Plasmids vereinfacht (Löbach, persönliche Mitteilung). In dieser Arbeit wurde die *argC*-Promotorregion von der chromosomalen DNA des *B. subtilis*-Wildtypstammes JH642 und verschiedener Δ *proBA*- bzw. Δ *proA*-Suppressormutanten mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte und der Vektor pPink wurden mit *Bam*HI und *Sma*I verdaut. Nach der Dephosphorylierung des Vektors erfolgte die Ligation mit dem Insert. Der Vektor pPink besitzt zwei Sequenzbereiche, welche die Reportergenfusion flankieren. Diese Bereiche sind homolog zum *amyE*-Genlokus in *B. subtilis* und ermöglichen mittels homologer Rekombination eine stabile Integration der Reportergenfusion in das Chromosom. Das für eine α -Amylase codierende *amyE*-Gen (Tachibana *et al.*, 1987) in *B. subtilis* ist nicht essentiell. Für die Selektion in *B. subtilis* besitzt das Plasmid pPink eine Chloramphenicol-Resistenzkassette, welche ebenfalls von den zwei *amyE*-Sequenzbereichen flankiert und stabil in das Genom integriert wird. Die Selektion in *E. coli* erfolgt über eine Ampicillin-Resistenzkassette. Die Richtigkeit der präparierten Plasmide wurde mittels Sequenzierung und Restriktionsverdau überprüft.

Das Plasmid pBluescript II KS (+)

Für die Konstruktion der Stämme pDST16 und pDST17, welche im GK-GPR-gekoppelten Enzymassay (4.4.4) zum Einsatz kamen, wurde das Plasmid pBluescript II KS (+) verwendet (Alting-Mees und Short, 1989). Die MCS dieses Plasmids enthält Erkennungssequenzen für eine große Auswahl an Restriktionsendonukleasen und ist innerhalb des 5'-Abschnitts des *lacZ*-Gens lokalisiert. In dieser Arbeit wurde das *proBA*-Operon des *B. subtilis* Wildtypstammes JH642 und das mutierte *proBA*-Operon des *B. subtilis*-Stammes DRB1 mittels PCR amplifiziert. Hierbei wurden über ein entsprechendes PCR-Primerdesign Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *KpnI* und *BamHI* an die PCR-Fragmente angehängt. Die PCR-Produkte und der Vektor pBluescript II KS (+) wurden mit *KpnI* und *BamHI* verdaut. Nach der Dephosphorylierung des Vektors erfolgte die Ligation des Insert direkt hinter einen *lac*-Promotor. Die Selektion positiver Klone erfolgte zum einen über eine Ampicillin-Resistenz für die das Plasmid codiert. Zum anderen konnte durch die Transformation in einen *E. coli*-Stamm, der den 3'-Abschnitt des *lacZ*-Gens in seinem Genom trägt, ein sogenanntes Blau-Weiß-Screening durchgeführt werden. Hierbei befand sich in den Selektionsplatten neben dem Antibiotikum Ampicillin auch die farblose Verbindung X-Gal. Bei der Spaltung von X-Gal durch die β -Galaktosidase entsteht der tiefblaue Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo. Bakterien, die das leere Plasmid tragen, bilden eine funktionsfähige β -Galaktosidase. Diese setzt sich aus dem plasmidkodierten Anteil und dem vom Genom des *E. coli*-Stammes kodierten Anteil zusammen. Negative Transformanten erscheinen demnach blau. Positive Transformanten, die hingegen ein Insert in der MCS des Plasmids tragen, bilden keine funktionsfähige β -Galaktosidase und können X-Gal nicht zu 5-Brom-4-Chlor-Indigo spalten. Sie erscheinen demnach weiß auf den Selektionsplatten. Die aus weißen Klonen präparierten Plasmide wurde mittels Sequenzierung und Restriktionsverdau überprüft.

Konstruktion von TreA-Fusionsstämmen

Die zur Konstruktion von *treA*-Reportergen-Fusionsstämmen verwendeten Plasmide (pDST32 - pSDT40) wurden zunächst mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *PstI* linearisiert. Aufgrund homologer Sequenzbereiche zum *amyE*-Genlokus in *B. subtilis* konnten die linearisierten Plasmide über doppelt homologe Rekombination

in das Genom der Empfängerstämme integriert werden. In den daraus resultierenden Stämmen ist das *amyE*-Gen durch die Insertion der Reportergenfusion und der Chloramphenicol-Resistenzkassette unterbrochen, was zu einem Verlust der Amylase-Aktivität führt. Daher wurden TreA-Reportergen-Fusionsstämme zunächst auf Chloramphenicol selektiert, über zwei Schritte aufgereinigt und anschließend auf den Verlust ihrer Amylase-Aktivität überprüft (4.4.4). Die *treA*-Reportergen-Fusionsstämme besitzen desweiteren eine chromosomale *treA*-Gendeletion, um die gemessene TreA-Aktivität allein der Promotoraktivität des Reportergen-Fusionskonstruktes zuschreiben zu können.

Konstruktion von Deletions-Insertions-Mutanten

Für die Konstruktion von Deletions-Insertions-Mutanten auf dem Chromosom von *B. subtilis* wurde die sogenannte LFH-PCR-Methode (*Long Flanking Homology*) angewandt. Diese Methode ermöglicht die Deletion eines Gens durch die Insertion einer Antibiotika-Resistenzkassette und erfolgt in zwei PCR-basierten Schritten (Kuwayama *et al.*, 2002). Zunächst werden drei unabhängige PCR-Reaktionen (4.3.1) zur Amplifikation der 5'-Region des Zielgens (Primer P1 und P2), der 3'-Region des Zielgens (Primer P3 und P4) und der Antibiotika-Resistenzkassette (Primer P2rev und P3rev) durchgeführt. Die Primer P2 und P3 sind mit 30 bp langen Überhängen ausgestattet, welche komplementär zur Antibiotika-Resistenzkassette sind. Auch die Primer P2rev und P3rev verfügen über 30 bp lange Überhänge. Diese sind komplementär zur 5'- und 3'-Region des Zielgens. In einem zweiten Schritt wurden die drei zuvor aufgereinigten PCR-Fragmente über ihre komplementären Enden in einer Fusions-PCR (Tab. 9) unter Verwendung der Primer P1 und P4 zusammengefügt. Anschließend wurde das Fusions-PCR-Produkt in *B. subtilis* transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Agarplatten, welche der inserierten Antibiotika-Resistenzkassette entsprachen. Die stabile Integration der Deletion in das Chromosom erfolgte durch homologe Rekombination, welche über die komplementären Bereiche der 5'- und 3'-Flanke des Konstruktes und des Zielgens vermittelt wurde. Für die Überprüfung der korrekten Integration des Konstruktes wurde die chromosomale DNA des Ausgangsstammes und der Deletionsmutante isoliert und in einer PCR-Reaktion mit den Primern P1 und P4 miteinander verglichen.

Tab. 9: PCR-Cycler-Programm für Fusions-PCR

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen
Anfangsdenaturierung	98°C	30 s	1
Denaturierung	98°C	10 s	30
Annealing	50°C	20 s	
Elongation	72°C	120 s	
Endelongation	72°C	5 min	1

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Quantifizierung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Zellextrakten erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Das Testprinzip beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung von 465 nm zu 595 nm durch Bindung an Proteine. Zunächst wurde ausgehend von einer BSA-Lösung bekannter Konzentration (0,1 mg/ml) eine Eichgerade erstellt (Tab. 10).

Tab. 10: Eichgerade BSA

µg/ml BSA	... µl 0,1 mg/ml BSA	... µl dH ₂ O	...µl Bradford-Reagenz
0	0	800	200
5	50	750	200
10	100	700	200
15	150	650	200
20	200	600	200
25	250	550	200

Die Ansätze wurden gut gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm mittels Photometer. Anschließend konnte mit Hilfe der gemessenen Extinktionswerte und der bekannten Proteinkonzentrationen eine Standardkurve erstellt werden.

Die Proteinproben unbekannter Konzentration wurden nach folgendem Schema vorbereitet und äquivalent zu den BSA-Proben weiter behandelt.

Proteinprobe:	x μ l
dH ₂ O:	(800 - x) μ l
Bradford-Reagenz:	200 μ l

Über den Anstieg der BSA-Eichgerade konnte nun die Proteinkonzentration (μ g/ml) der Probe berechnet werden. Die Probenkonzentration sollte immer im Größenbereich der Eichgerade liegen. Folglich war eine Verdünnung der für den Assay eingesetzten Proteinproben notwendig.

4.4.2 Quantifizierung von Prolin mittels Ninhydrin-Methode

Die Quantifizierung von Prolin erfolgte mit Hilfe der von Bates *et al.* (1973) beschriebenen sauren Ninhydrin-Methode. Dabei reagiert Ninhydrin im sauren Milieu mit den Aminogruppen der Aminosäuren und bildet einen blauen Farbstoff. Bei sekundären Aminosäuren wie dem Prolin entsteht hingegen ein roter Farbkomplex. Die Extinktion des Prolinderivates kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 480 nm bestimmt werden. Dabei sind die Konzentration des Farbstoffes und die Konzentration von Prolin proportional (Lambert Beersches Gesetz). Zur Bestimmung des intrazellulären Prolin-Pools wurden *B. subtilis*-Zellen bis zu einer OD₅₇₈ von 1,8 bis 2,0 in SMM in Abwesenheit oder Anwesenheit verschiedener NaCl-Konzentrationen angezogen. Anschließend wurden 8 ml der Bakterienkultur abzentrifugiert (8 min, 5000 rpm, 20°C), der Überstand verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert. Für den Assay wurde das Zellpellet in 900 μ l SSA-Lösung resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte über Nacht unter starkem Schütteln im Thermomixer (750 rpm, 20°C). Zum Abtrennen der Zelltrümmer wurden die aufgeschlossenen Zellen zentrifugiert (15 min, 13000 rpm) und der Überstand (Zellextrakt) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 500 μ l des Zellextraktes wurden mit 500 μ l Ninhydrin-Lösung und 500 μ l Eisessig versetzt und für eine Stunde im Wasserbad (100°C) gekocht. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Proben mit 2 ml Toluol versetzt, 30 s gründlich gevortext und für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Extinktion des roten Prolin-Ninhydrin-Farbkomplexes in der Toluolphase wurde gegen Toluol als Blindwert bei einer Wellenlänge von 480 nm bestimmt. Die Konzentration von L-Prolin konnte mit Hilfe des Anstiegs einer Eichgerade (0 - 8 mM L-Prolin) berechnet werden.

SSA-Lösung

3 % (w/v) 5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat

Ninhydrin-Lösung

Ninhydrin	1,25	g
Eisessig	30	ml
6 M Phosphorsäure	20	ml

4.4.3 Quantifizierung von Aminosäuren mittels HPLC

Die Zellen für die quantitative HPLC-Analyse von L-Arginin und L-Glutamat wurden in 1 x SMM mit 0 M NaCl oder 1,2 M NaCl kultiviert, bei einer OD₅₇₈ von 1,8 geerntet (10 min, 13000 rpm) und anschließend lyophyllisiert. Die Extraktion der Aminosäuren erfolgte nach der Methode von Bligh und Dyer (1959). Die getrockneten Zellen wurden in 500 µl BD-Lösung (Methanol/ Chloroform/ Wasser, 10:5:4, v/v/v) aufgenommen und anschließend für 30 min im Ultraschallbad und für 30 min im Schüttler homogenisiert. Nach Zugabe von 130 µl Chloroform und 130 µl Wasser wurden die Zellen für weitere 30 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert (13000 rpm, 15 min). Die obere alkoholische Phase (450 µl) wurde abgenommen und über Nacht bei 55°C im Thermomixer unter dem Abzug getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl Wasser aufgenommen. Eventuelle Präzipitate wurden abzentrifugiert (15 min, 13000 rpm).

Alle Proben und Standardlösungen wurden mittels o-Phthaldialdehyd (OPA) und Fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) automatisiert online derivatisiert. Primäre Aminosäuren reagieren mit OPA wohingegen sekundäre Aminosäuren mit FMOC derivatisiert werden. Die OPA-Reagenz wurde 1:10 in 0,5 % Mercaptoethanol verdünnt. Die 0,5 %-ige Mercaptoethanol-Lösung wurde mit Borat-Puffer (0,4 N in H₂O; pH10,2) angesetzt. Für die HPLC-Messungen wurde folgendes Injektor-Programm (Tab. 11) verwendet:

Tab. 11: Injektor-Programm

Funktion	Parameter
ziehen	2,5 µl Borat-Puffer
ziehen	0,5 µl Probe
mischen	3 µl, in Luft, max. Geschwindigkeit, 2 x
warten	0,5 min
ziehen	0 µl H ₂ O (Waschschritt)
ziehen	0,5 µl OPA
mischen	3,5 µl, in Luft, max. Geschwindigkeit, 6 x
ziehen	0 µl H ₂ O (Waschschritt)
ziehen	0,5 µl FMOc
mischen	4 µl, in Luft, max. Geschwindigkeit, 6 x
ziehen	32 µl H ₂ O
mischen	18 µl, in Luft, max. Geschwindigkeit, 2 x
injizieren	37,5 µl

Die Proben wurden mit einem *Reversed-Phase*-System bestehend aus einer Vorsäule und einer Hauptsäule analysiert. Beide Säulen stammen von der Firma Phenomenex. Für die Aminosäure-Auftrennung wurden Lösungsmittel A (40 mM NaH₂PO₄; pH7,8) und Lösungsmittel B (Acetonitril, Methanol, Wasser; 45 : 45 : 10) eingesetzt. Die Chromatographie erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/ min bei einer Temperatur von 37°C unter Verwendung des in Tabelle 12 dargestellten Gradienten. Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe der in Tabelle 13 gezeigten Einstellungen detektiert.

Tab. 12: Gradient zur Auftrennung von Aminosäuren

Zeit (min)	Lösungsmittel A (%)	Lösungsmittel B (%)
0	100	0
40,5	59,5	40,5
41	39	61
43	39	61
44	18	82
44,5	0	100
46,5	0	100
47	100	0
49	100	0

Tab. 13: Einstellungen Fluoreszenz-Detektor

Zeit (min)	Anregung (nm)	Emission (nm)
0	340	450
43,5	266	305

Die Aufzeichnung und Integration der Detektorsignale erfolgte mit Hilfe der Analysesoftware Openlab[®]. Die Standards für die Ermittlung der Retentionszeiten und für die Quantifizierung wurden mit Reinsubstanzen von Arginin und Glutamat ermittelt. Für die Kalibrierung wurden mindestens 6 verschiedene bekannte Arginin- und Glutamat-Konzentrationen herangezogen.

4.4.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Bestimmung der TreA-Aktivität

Das Reportergen *treA* codiert für eine salztolerante Phospho- α -1,1-Glukosidase (TreA) von *B. subtilis* (Gotsche und Dahl, 1995; Schröck *et al.*, 1996). Die enzymatische Aktivität von TreA kann durch einen kolorimetrischen Test nachgewiesen werden. Die Glukosidase spaltet Trehalose-6-Phosphat in Glukose und Glukose-6-Phosphat. Desweiteren ist das Enzym dazu in der Lage das chromogene Substrat pNPG (para-Nitrophenyl- α -Glucopyranosid) *in vitro* zu spalten, wobei ein Reaktionsprodukt mit gelber Färbung entsteht (Helfert *et al.*, 1995). Diese Färbung ist photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm quantifizierbar und dient als Maß für das Expressionslevel des jeweiligen Fusions-Konstrukts. Die Expression des Reportergens *treA* unter der Kontrolle der Promotorregion des *argC*-Operons wurde in SMM ohne und mit Zugabe von 20 mM L-Arginin untersucht. Für den Enzymtest wurden die zu untersuchenden Stämme bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{578} \sim 1,5$) kultiviert. Anschließend wurden 1,8 ml der Kultur abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm, RT) und das Pellet in 500 μ l Z-Puffer resuspendiert. Die Hydrolyse der Zellwand erfolgte durch die Zugabe von 25 μ l Lysozym (20 mg/ml) und 5-minütiger Inkubation bei 37°C. Zelltrümmer wurden durch anschließende Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, RT) entfernt. 400 μ l des Überstandes wurden mit 400 μ l Z-Puffer gemischt. Die eigentliche Reaktion wurde mit 200 μ l pNPG-Lösung gestartet. Proben wurden so lange im Wasserbad inkubiert,

bis eine Gelbfärbung eintrat. Die maximale Inkubationsdauer betrug 3 Stunden. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 500 µl Na₂CO₃ gestoppt. Die Start- und Stopzeit der Reaktion wurde exakt notiert. Die Extinktion der gestoppten Proben wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt und die TreA-Aktivität nach folgender Formel berechnet:

$$A_{\text{TreA}} = \frac{1500 * E_{420}}{V * \Delta t * OD_{578} * 0,8}$$

A_{TreA} : Spezifische TreA-Aktivität (nmol⁻¹*min⁻¹*mg⁻¹ = Einheit pro mg Protein)

E_{420} : Extinktion des Spaltproduktes o-Nitrophenol bei 420 nm

OD_{578} : Optische Dichte der Bakteriensuspension bei 578 nm

V: im Test eingesetztes Kulturvolumen in ml

Δt : Zeit vom Start der Reaktion mit pNPG bis zum Stoppen mit Na₂CO₃

Der Faktor 1500 [µmol * mg⁻¹ * ml] berücksichtigt den Extinktionskoeffizienten von *p*-Nitrophenol ($\epsilon_{405} = 18300 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$), die Küvettendicke von 1 cm, das Reaktionsvolumen von 1,5 ml sowie die Definition, dass eine vollinduzierte Kultur eine Aktivität von 1000 Miller Units pro mg Protein aufweist. Der Faktor 0,1 muss eingerechnet werden, da vorausgesetzt wird, dass eine OD_{578} von 1 einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml entspricht (siehe β -Galaktosidase-Enzymtest; Silhavy *et al.*, 1984). Der Faktor 0,8 dient zur Korrektur des eingesetzten Volumens.

Z-Puffer

Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	10,7	g	
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	5,5	g	
KCl	0,75	g	
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,246	g	
dH ₂ O	<i>ad</i>	1	l (pH 7,0 einstellen)

pNPG-Lösung

4-Nitrophenyl α -D-Glucopyranosid in 10 mM K-Phosphat-Puffer (pH 7,5)

Bestimmung der α -Amylase-Aktivität

Um die Integration von *treA*-Reportergenkonstrukten in das chromosomale *amyE*-Gen von *B. subtilis* zu überprüfen wurde ein Amylase-Aktivitätstest durchgeführt (Cutting und Vander Horn, 1990). Für den Nachweis wurden potentiell korrekte *B. subtilis*-Stämme auf 1 %-igen Stärkeplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen von der Platte gekratzt und die Platte mit Kaliumjodid-Lösung (0,5 % Jod [w/v] und 1 % Kaliumiodid [w/v]) überschichtet. Diese Lösung färbt Stärke dunkelblau an. Stämme mit intaktem Amylase-Gen verstoffwechseln die in der Agarplatte vorhandene Stärke und zeichnen sich durch einen stärkefreien hellen Hof aus, während der Rest der Platte dunkelblau gefärbt ist. Stämme mit unterbrochenem Amylase-Gen zeigen hingegen keinen hellen Hof.

Bestimmung der γ -Glutamyl-Kinase-Aktivität

Für die Bestimmung der Aktivität der γ -Glutamat-Kinase ProB aus *B. subtilis* wurden die *E. coli*-Stämme pDST16 und pDST17 genutzt. Diese $\Delta proBA$ -Stämme sind Plasmid-vermittelt mit dem *proBA*- bzw. *proB**A-Operon aus *B. subtilis* komplementiert. Als Kontrolle wurde der Stamm pDST18 mitgeführt, welcher das leere Plasmid enthält. Die entsprechenden Stämme wurden in 800 ml M63-Minimalmedium mit Zusatz von 100 μ g/ml Ampicillin im Luftschüttler (37°C, 220 rpm) kultiviert und bei einer OD₅₇₈ von 1,8 geerntet (20 min, 9000 rpm, 4°C). Für die Kultivierung des Stammes pDST18 wurden zusätzlich 10 mM Prolin in das Medium gegeben. Das Pellet wurde mit TD-Puffer (50 mM Tris-HCl, 1mM DTT, pH 7,2) gewaschen und erneut zentrifugiert (20 min, 5000 rpm, 4°C). Bis zur weiteren Verwendung konnte das gewaschene Pellet bei - 20 °C gelagert werden. Für den Zellaufschluss wurde das aufgetaute Pellet zunächst in 10 ml TD-Puffer resuspendiert, mit Lysozym (2 mg/ml) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Desweiteren erfolgten 5 Durchläufe mit der French-Press. Das Zelllysate wurde für 35 min bei 35000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für einen γ -Glutamat-Kinase- γ -Glutamat-Phosphat-Reduktase-(γ -GK/ γ -GPR)-gekoppelten Aktivitätsassay eingesetzt. Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 37°C in 100 mM Tris-HCl (pH 7,2), 50 mM Natrium-Glutamat, 0,15 mM NADPH, 5 mM ATP und 1 mM DTT und verschiedenen Konzentrationen an

L-Prolin (0 mM; 0,01 mM; 0,1 mM; 1 mM; 10 mM; 100 mM; 1000 mM). Die Aktivität der γ -Glutamat-Kinase kann über die Abnahme der NADPH-Rate photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt werden (Abb. 6). Eine Unit γ -GK/ γ -GPR entspricht hierbei der Oxidation von 1 nmol NADPH min⁻¹. Die Menge des eingesetzten Proteins betrug 2,5 mg. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Test (4.4.1) bestimmt.

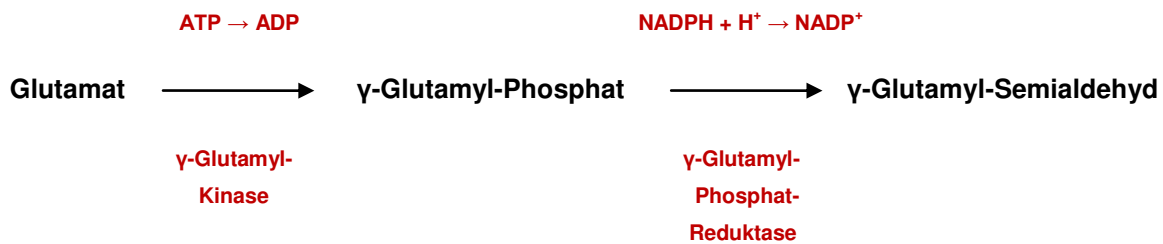


Abb. 6: Bestimmung der Enzymaktivität der γ -Glutymyl-Kinase mittels γ -GK/ γ -GPR-gekoppelter Reaktion

Glutamat wird über die γ -Glutamyl-Kinase zunächst unter ATP-Verbrauch in γ -Glutamyl-Phosphat umgewandelt. In einem zweiten Schritt erfolgt die Umwandlung des Zwischenproduktes in γ -Glutamyl-Semialdehyd. Diese Reaktion ist NADPH-abhängig. Die Aktivität der γ -Glutamat-Kinase kann über die Abnahme der NADPH-Rate photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt werden.

4.5 Bioinformatische Methoden

4.5.1 Computersoftware

Für das Anfertigen dieser Arbeit wurde folgende Computersoftware genutzt:

Tab. 14: Computersoftware

Programm	Anwendung
Microsoft® Office Standard Edition 2007/10	Text- und Datenverarbeitung
ApE – A plasmid Editor	Erstellen von Plasmiden, Verarbeitung von DNA-Sequenzen, Primer-Design
Mega5.05 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis	Auswertung von Sequenzierdaten, Erstellen von Alignments
PyMOL (TM) - DeLano Scientific LLC	Visualisierung von 3D-Proteinstrukturen

4.5.2 Internetplattformen

Für das Anfertigen dieser Arbeit wurden die in der Tabelle 15 aufgeführten Internetplattformen genutzt.

Tab. 15: Internetplattformen

URL	Anbieter	Anwendung
http://genolist.pasteur.fr/	Institut Pasteur, Paris (Lechat <i>et al.</i> , 2008)	Sequenzrecherche im Genom von <i>B. subtilis</i>
http://www.subtiwiki.unigoettingen.de/wiki/index.php	Georg-August-Universität Göttingen (Mäder <i>et al.</i> , 2008)	Genomrecherche in <i>B. subtilis</i>
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	National Center for Biotechnology Information at the National Institutes of Health, Bethesda, USA (Altschul <i>et al.</i> , 1990)	Literaturrecherche, BLAST-Server
http://swissmodel.expasy.org/	SWISS-Model, SIB - Swiss Institute of Bioinformatics & the Biozentrum University of Basel, Schweiz (Arnold <i>et al.</i> , 2006)	Erstellung von 3D-Strukturmodellen aus Aminosäuresequenzen

5 Ergebnisse

5.1 Regulation der γ -Glutamyl-Kinase in *B. subtilis*

B. subtilis realisiert die Prolinbiosynthese über zwei verschiedene Wege. Der anabole ProB-ProA-Prol-Weg wird zur Prolinproduktion für die Proteinbiosynthese genutzt, während der osmoadaptive ProJ-ProA-ProH-Weg der Bereitstellung großer Prolinmengen für den Einsatz als Osmostress-Schutzsubstanz dient (Brill *et al.*, 2011 b). Die γ -Glutamylkinasen ProB und ProJ sind Isoenzyme, welche den jeweils ersten Schritt der beiden Prolinbiosynthesewege katalysieren, und unterscheiden sich maßgeblich hinsichtlich ihrer Regulation. Die Expression des *proBA*-Operons wird in Anpassung an die intrazelluläre Prolinkonzentration durch ein T-Box-regulatorisches System kontrolliert (Brill *et al.*, 2011 a; Chopin *et al.*, 1998). Die Expression des *proHJ*-Genclustern steht hingegen unter osmotischer Kontrolle und wird durch den Anstieg der externen Osmolarität induziert (Brill *et al.*, 2011 b; Hahne *et al.*, 2010; Steil *et al.*, 2003). Auf Proteinebene wird das anabole ProB-Enzym zusätzlich durch Prolin allosterisch Feedback-reguliert (Chen *et al.*, 2007). Die folgenden Abschnitte befassen sich im Genaueren mit der Regulation der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aus *B. subtilis*.

5.1.1 Bioinformatische Analyse der γ -Glutamyl-Kinasen verschiedener *Bacillus*-Spezies

Während die Enzymaktivität der γ -Glutamyl-Kinase ProB mittels Feedback-Inhibition durch Prolin reguliert wird scheint es offensichtlich, dass die γ -Glutamyl-Kinase ProJ nicht signifikant Feedback-reguliert sein kann, da sie ansonsten in osmotisch gestressten Zellen, welche sehr hohe intrazelluläre Prolinlevel anhäufen (Whatmore *et al.*, 1990), nicht funktionsfähig wäre. Ein experimenteller Beweis für diese Aussage wurde bisher nicht erbracht.

In Prokaryonten und Eukaryonten sind viele Aminosäure-Substitutionen in γ -Glutamyl-Kinasen beschrieben, welche die allosterische Regulation durch Prolin aufheben (Perez-Arrelano *et al.*, 2010 a). Die Kristallstruktur der γ -Glutamyl-Kinase ProB aus *E. coli* (Perez-Arrelano *et al.*, 2010 a; Perez-Arrelano *et al.*, 2006) zeigt,

dass die Bindestelle des Substrates Glutamat teilweise mit der Bindestelle des Inhibitors Prolin überlappt. Die Interaktion beider Moleküle mit dem Enzym wird durch einen 16 Aminosäuren langen flexiblen Loop moduliert, welcher das β -Faltblatt 4 und die α -Helix E miteinander verbindet (Perez-Arrelano *et al.*, 2010 b). Der Glutamat-Rest an der Position 153 des Enzyms ist Teil dieses Loops. Ein Austausch dieses Aminosäure-Restes gegen die positiv geladene Aminosäure Lysin in der γ -Glutamyl-Kinase von *Lycopersicon esculentum* (Tomate, *tomPRO1*) führt vergleichend zum Wildtyp zu einer Abnahme der Feedback-Inhibition durch Prolin, zu einer Erhöhung des intrazellulären Prolingehaltes sowie einem Anstieg der osmotischen Toleranz (Fujita *et al.*, 2003). Das gleiche Phänomen konnte für bakterielle γ -Glutamylkinasen gezeigt werden (Dandekar *et al.*, 1988; Sleator *et al.*, 2001). Dementsprechend scheint dieser Glutamat-Rest eine Schlüsselrolle in der Prolin-vermittelten Feedback-Inhibition sowohl von pflanzlichen als auch bakteriellen γ -Glutamylkinasen einzunehmen.

Aufbauend auf diese Erkenntnisse konnte festgestellt werden, dass auch das durch Prolin Feedback-inhibierte Enzym ProB aus *B. subtilis* (Chen *et al.*, 2007) einen negativen Glutamat-Rest (E142) an der entsprechenden Position im flexiblen Loop aufweist, während das ProJ-Protein einen positiv geladenen Arginin-Rest (R146) an dieser Position zeigt.

Mit Hilfe bioinformatischer Methoden wurde in der vorliegenden Arbeit der flexible Feedback-Loop von γ -Glutamyl-Kinasen des ProB- und des ProJ-Typs verschiedener Vertreter der Gattung *Bacillus* untersucht. Analysiert wurden hierbei insgesamt 85 Genome (Stand: 01.02.2016) (Abb. 7, Abb. 8).

Alle γ -Glutamyl-Kinasen des ProB-Typs zeigten einen negativ geladenen Glutamat-Rest (E142) an der entsprechenden Position (Abb. 7) und sind daher vermutlich Feedback-reguliert.

Desweiteren wurden ProJ-Proteine untersucht, welche in einem Operon des *proHJ*-Typs oder des *proHJAA*-Typs organisiert sind (Abb. 8). Der *proHJ*-Typ ist z.B. in *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens* vorzufinden, wobei das Gen *proJ* hinter dem *proH*-Gen lokalisiert ist. Bei dem *proHJAA*-Typ ist das *proJ* Teil eines längeren Operons, welches ein zusätzliches *proA*-Gen (*proAA*) enthält.

<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	N	E	N	D	S	T	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	N	E	N	D	S	I	S	L	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames	N	E	N	D	S	I	S	L	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16	N	E	N	D	S	T	S	V	D	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	N	E	N	D	S	V	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus thuringiensis</i> str. AI Hakam	N	E	N	D	S	I	S	L	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. B14905	N	E	N	D	T	V	S	I	S	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4	N	E	N	D	S	I	S	L	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus pseudomycoloides</i> DSM 12442	N	E	N	D	S	I	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus pseudofirmus</i> OF4	N	E	N	D	S	T	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus megaterium</i> DSM319	N	E	N	D	T	V	A	I	D	E	I	E	N	I	V	R	-	-	-
<i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10	N	E	N	D	S	T	S	I	D	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7	N	E	N	D	S	T	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	N	E	N	D	S	T	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus cellulosilyticus</i> DSM 2522	N	E	N	D	S	T	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. BT1B CT2 cont14	N	E	N	D	S	V	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. 2 A 57 CT2 cont153	N	E	N	D	S	V	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus coagulans</i> 2-6	N	E	N	D	S	V	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i>	N	E	N	D	T	V	S	V	D	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. INLA3E	N	E	N	D	T	V	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. JS	N	E	N	D	S	T	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. 5B6	N	E	N	D	S	T	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. 7 6 55CFAA CT2	N	E	N	D	S	I	S	L	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus smithii</i> 7 3 47FAA	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. 37MA	N	E	N	D	S	I	S	I	E	E	L	T	-	-	-	Y	-	-	-
<i>Bacillus fordii</i> DSM 16014	N	E	N	D	T	V	A	V	D	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus acidiproducens</i> DSM 23148	N	E	N	D	T	V	S	V	A	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus isronensis</i> B3w22	N	E	N	D	T	V	S	V	A	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus ailingensis</i> DSM 18341	N	E	N	D	T	I	A	V	D	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus chagannorensis</i> DSM 18086	N	E	N	D	S	T	A	V	D	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus panaciterrae</i> DSM 19096	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. HYC-10	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus aerophilus</i> KACC 16563	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus sonorensis</i> L12	N	E	N	D	S	V	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus vallismortis</i> DV1-F-3	N	E	N	D	S	T	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus timonensis</i> MM10403188	N	E	N	D	S	V	S	L	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus massiliosenegalis</i> JC63	N	E	N	D	S	V	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> ATCC 23296	N	E	N	D	T	V	S	I	A	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. ZYK	N	E	N	D	S	V	A	V	D	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. FJAT-13831	N	E	N	D	S	I	S	L	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613	N	E	N	D	S	T	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus oceanisediminis</i> 2691	N	E	N	D	S	V	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus endophyticus</i> 2102	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. WBUNB001A	N	E	N	D	S	I	S	L	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. WBUNB009	N	E	N	D	S	I	S	L	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. WBUNB004	N	E	N	D	S	I	S	L	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. LI(2012)	N	E	N	D	S	T	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. NSP9.1	N	E	N	D	S	V	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. SB47	N	E	N	D	S	V	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus safensis</i> VK	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus bogoriensis</i> ATCC BAA-922	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112	N	E	N	D	S	I	S	L	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus marmarensis</i> DSM 21297	N	E	N	D	S	T	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus pumilus</i> B6033	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus manganilyticus</i> JCM 10596	N	E	N	D	S	V	S	V	N	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. JCM 19047	N	E	N	D	S	T	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus firmus</i> DS1	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. FJAT-14578	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. RP1137	N	E	N	D	T	V	A	I	D	E	I	E	N	I	V	R	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. FJAT-14515	N	E	N	D	T	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. 72	N	E	N	D	S	I	S	I	E	E	L	T	-	-	-	Y	-	-	-
<i>Bacillus</i> sp. NSP2.1	N	E	N	D	T	V	S	V	A	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. TS-2	N	E	N	D	T	T	S	I	Q	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. JCM 19046	N	E	N	D	T	T	S	V	D	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. JCM 19045	N	E	N	D	T	T	S	V	D	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. H1m	N	E	N	D	S	I	S	L	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. H1a	N	E	N	D	S	I	S	L	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus flexus</i> T6186-2	N	E	N	D	T	V	A	I	D	E	I	E	N	I	V	R	-	-	-
<i>Bacillus methanolicus</i> MGA3	N	E	N	D	T	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus lehensis</i> G1	N	E	N	D	S	T	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. D'w5-4	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622	N	E	N	D	S	T	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus mycoloides</i> 219298	N	E	N	D	S	I	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. G2(2012b)	N	E	N	D	T	V	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. YF23	N	E	N	D	S	I	S	L	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus hemi-cellulosilyticus</i> JCM 9152	N	E	N	D	S	I	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus wakoensis</i> JCM 9140	N	E	N	D	S	T	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus akibai</i> JCM 9157	N	E	N	D	S	T	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus methylotrophicus</i> JJ-D34	N	E	N	D	S	T	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. MT2	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus indicus</i> LMG 22858	N	E	N	D	T	V	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus cibi</i> DSM 16189	N	E	N	D	T	V	S	V	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. JCE	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N
<i>Bacillus</i> sp. FF4	N	E	N	D	S	V	S	I	E	E	L	T	-	-	-	F	G	D	N

Abb. 7: Sequenz-Alignment der γ -Glutamyl-Kinase ProB aus *B. subtilis* (Position 133 - 148) und γ -Glutamyl-Kinasen des ProB-Typs verschiedener *Bacillus*-Spezies

Aminosäure-Reste, die in mehr als der Hälfte der untersuchten γ -Glutamyl-Kinasen vorkommen sind grau unterlegt. Der konservierte negativ geladene Aminosäure-Rest Glutamat an der Position 142 (E142) der γ -Glutamyl-Kinase ProB aus *B. subtilis* und entsprechende Positionen aller weiteren *Bacillus*-Spezies sind rot unterlegt.

proHJ-Typ	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus atrophaeus</i> 1942	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus</i> sp. JS	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus</i> sp. 5B6	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus mojavensis</i> RO-H-1	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus vallismortis</i> DV1-F-3	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus oceanisediminis</i> 2691	N	E	N	D	T	V	T	V	D	R	L	R	F	G	D	N
	<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus methylotrophicus</i> JJ-D34	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus</i> sp. SG-1	N	E	N	D	T	V	T	I	D	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus megaterium</i> DSM319	N	E	N	D	T	V	T	I	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus</i> sp. BT1B CT2 cont12	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus</i> sp. 2 A 57 CT2 cont185	N	E	N	D	T	V	T	V	D	R	L	R	F	G	D	N
	<i>Halobacillus halophilus</i> DSM 2266	N	E	N	D	T	I	T	I	D	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Halobacillus kuroshimensis</i> DSM 18393	N	E	N	D	T	I	T	I	D	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus aurantiacus</i> DSM 18675	N	E	N	D	T	I	T	T	D	R	L	R	F	G	D	N
	<i>Halobacillus</i> sp. BAB-2008	N	E	N	D	T	I	T	I	D	R	L	K	F	G	D	N
proHJAA-Typ	<i>Bacillus</i> sp. HYC-10	N	E	N	D	T	V	T	I	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus aerophilus</i> KACC 16563	N	E	N	D	T	V	T	I	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus sonorensis</i> L12	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus timonensis</i> MM10403188	N	E	N	D	T	L	S	T	E	R	L	N	F	G	D	N
	<i>Bacillus endophyticus</i> 2102	N	E	N	D	T	V	T	V	D	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus</i> sp. NSP9.1	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus</i> sp. SB47	N	E	N	D	T	V	T	V	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus safensis</i> VK	N	E	N	D	T	V	T	I	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus marmarensis</i> DSM 21297	N	E	N	D	T	I	T	I	K	Q	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus pumilus</i> B6033	N	E	N	D	T	V	T	I	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus firmus</i> DS1	N	E	N	D	T	V	T	V	D	R	L	R	F	G	D	N
	<i>Bacillus</i> sp. FJAT-14578	N	E	N	D	T	V	T	I	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus</i> sp. RP1137	N	E	N	D	T	V	T	I	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b	N	E	N	D	T	V	T	I	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus flexus</i> T6186-2	N	E	N	D	T	V	T	I	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus</i> sp. D'w5-4	N	E	N	D	T	V	T	I	N	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus wakoensis</i> JCM 9140	N	E	N	D	T	I	T	I	K	Q	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus</i> sp. ES.034	N	E	N	D	T	V	T	I	D	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus vietnamensis</i> HD-02	N	E	N	D	T	V	T	I	D	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus aquimaris</i>	N	E	N	D	T	V	T	V	D	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus indicus</i> LMG 22858	N	E	N	D	T	I	T	V	D	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Bacillus cibi</i> DSM 16189	N	E	N	D	T	I	T	V	D	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Halobacillus dabanensis</i> HD-02	N	E	N	D	T	I	T	I	D	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Halobacillus karajensis</i> HD-03	N	E	N	D	T	I	T	I	D	R	L	K	F	G	D	N
	<i>Halobacillus trueperi</i> HT-01	N	E	N	D	T	I	T	I	D	R	L	K	F	G	D	N

Abb. 8: Sequenz-Alignment der γ -Glutamyl-Kinase ProJ aus *B. subtilis* (Position 137 - 152) und γ -Glutamyl-Kinasen des ProJ-Typs verschiedener *Bacillus*-Spezies

Aminosäure-Reste, die in mehr als der Hälfte der untersuchten γ -Glutamyl-Kinasen vorkommen sind grau unterlegt. Der konservierte positive Aminosäure-Rest Arginin an der Position 146 (R146) der γ -Glutamyl-Kinase ProJ aus *B. subtilis* und entsprechende Positionen aller weiteren *Bacillus*-Spezies sind rot unterlegt. Der abweichende neutrale Aminosäure-Rest Glutamin an dieser Position für *B. marmarensis* und *B. wakoensis* ist Hellrot unterlegt. Die Zugehörigkeit der jeweiligen *Bacillus*-Spezies zum proHJ- bzw. zum proHJAA-Typ ist durch Klammern gekennzeichnet.

Diese Form der Operon-Organisation ist z.B. in *B. licheniformis* und in *Halobacillus halophilus* vorzufinden (Schroeter *et al.*, 2013; Saum und Müller, 2007). Die Alignements konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem proHJ und

dem *proHJAA*-Typ aufzeigen. So zeigten alle putativ nicht Feedback-regulierten γ -Glutamyl-Kinasen des ProJ-Typs einen positiv geladenen Arginin-Rest (R146) an der entsprechenden Position (Abb. 8). Ausnahmen stellten die Stämme *Bacillus marmarensis* und *Bacillus wakoensis* dar, welche anstelle des positiven Arginins den neutralen Aminosäure-Rest Glutamin aufwiesen (Abb. 8).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Art der Aminosäure an der Position 142 der ProB-Glutamat-Kinase und der Position 146 der ProJ-Glutamat-Kinase innerhalb der Gattung *Bacillus* hoch konserviert ist. Alle vermutlich durch Prolin allosterisch regulierten ProB-Proteine weisen die negativ geladene Aminosäure Glutamat an dieser Position auf, während alle vermutlich nicht Feedback-regulierten ProJ-Proteine einen positiven (Arginin) oder in Einzelfällen einen neutralen (Glutamin) Aminosäure-Rest an dieser Position zeigen. Für alle untersuchten Proteine des ProB- und ProJ-Typs konnte prinzipiell eine sehr hohe Konservierung der gesamten Sequenz des 16 Aminosäuren langen flexiblen Loops festgestellt werden.

5.1.2 Aminosäure-Substitution im flexiblen Loop der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aus *B. subtilis*

Auf Grundlage der bioinformatischen Analysen (5.1.1) sollte nun die Bedeutung der Aminosäure E142 im flexiblen Loop der γ -Glutamyl-Kinase ProB und der Aminosäure R146 im flexiblen Loop der γ -Glutamyl-Kinase ProJ aus *B. subtilis* untersucht werden. Dies sollte in Hinblick auf die Feedback-Inhibition durch Prolin sowie die physiologischen Konsequenzen für osmotisch gestresste Zellen geschehen. Für die Untersuchungen wurden *B. subtilis*-Mutanten konstruiert, bei denen die negative Aminosäure Glutamat (E142) im anabolen ProB gegen die positive Aminosäure Arginin (E142R) ausgetauscht wurde (Abb. 9 A). Die ProB-Mutante wird im Folgenden als ProB* bezeichnet.

Desweiteren wurde in einer zweiten Mutante die positive Aminosäure Arginin (R146) im osmoadaptiven ProJ gegen die negative Aminosäure Glutamat (R146E) ersetzt (Abb. 9 A). Die ProJ-Mutante wird im Folgenden als ProJ* bezeichnet. ProB wird, anders als ProJ, neben der allosterischen Regulation durch Prolin auf Proteinebene auch auf transkriptioneller Ebene durch ein T-Box-regulatorisches System kontrolliert

(Brill *et al.*, 2011 a). Aus diesem Grund wurden neben der Feedback-Mutante ProB* auch T-Box-Deletionsmutanten konstruiert, um die Regulation der γ -Glutamyl-Kinase ProB auch auf transkriptioneller Ebene zu entfernen. Die T-Box-Deletion wurde sowohl in den Wildtypstamm JH642 als auch in die ProB*-Mutante integriert und wird im Folgenden als ΔT bezeichnet (Abb. 9 B).

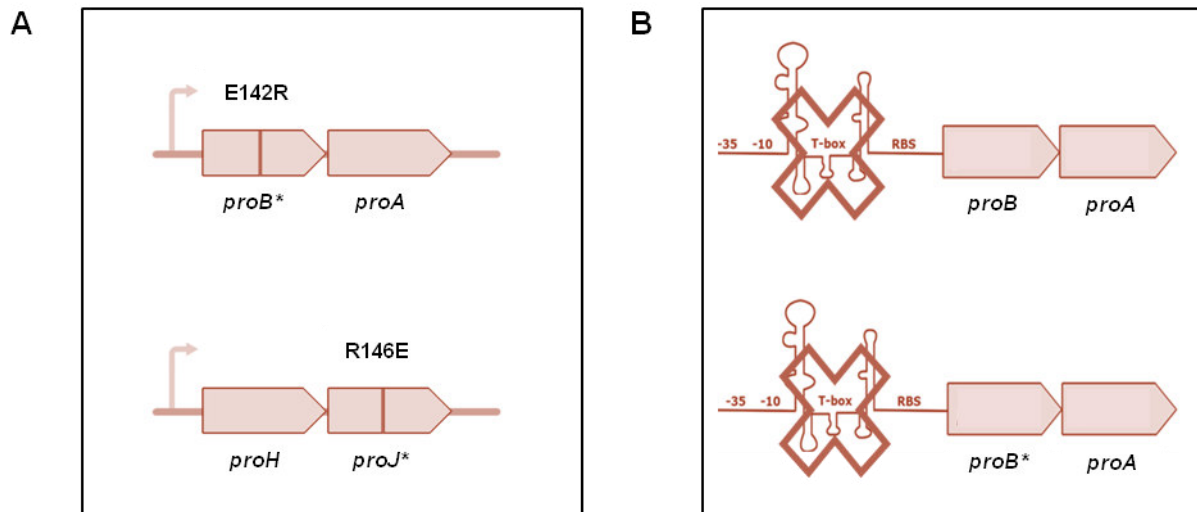


Abb. 9: Stammkonstruktion Feedback- und T-Box-Mutanten

(A) Die Feedback-Mutante DRB2 weist eine Punktmutation im anabolen *proB*-Gen auf, welche zu einem Aminosäure-Austausch an der Position 142 des Proteins führt (E142R). Die Feedback-Mutante DRB3 ist durch eine Punktmutation im osmoadaptiven *proJ*-Gen gekennzeichnet, welche eine Aminosäure-Substitution an der Position 146 des Proteins bewirkt (R146E). (B) Die T-Box-Mutanten weisen eine Deletion des T-Box-regulatorischen Systems im Promotorbereich von *proB* auf. In DRB12 ist diese Deletion mit dem *proB* des Wildtyps und in DRB13 mit dem mutierten *proB** kombiniert.

Zusammenfassend kann die Konstruktion von insgesamt vier Feedback- und T-Box-Mutanten festgehalten werden. Die ProB*-Mutante DRB2 (Abb. 9 A) hat voraussichtlich auf Proteinebene ihre Regulation durch Prolin verloren. Für die ProJ*-Mutante DRB3 (Abb. 9 A) wird erwartet, dass sie auf Proteinebene nun durch Prolin reguliert wird. Die T-Box-Mutante mit Wildtyp-ProB DRB12 (Abb. 9 B) sollte auf transkriptioneller Ebene keine Regulation mehr aufweisen. Wohingegen die Kombination von T-Box-Mutante und ProB*-Mutante im Stamm DRB13 (Abb. 9 B) zu einem Verlust der transkriptionellen Regulation und der Regulation auf Proteinebene führen sollte. Diese vier Stämme wurden im Folgenden zunächst hinsichtlich ihrer osmotischen Toleranz und ihrer Fähigkeit zur intrazellulären Prolinakkumulation untersucht.

5.1.3 Einfluss der Aminosäure-Substitution in ProB und ProJ auf die osmotische Toleranz von *B. subtilis*

Um zu untersuchen, ob der Aminosäure-Austausch im flexiblen Loop der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ zu einer Veränderung in der Salztoleranz von *B. subtilis* führt, wurde das Wachstum der Stämme DRB2 (ProB*), DRB3 (ProJ*), DRB12 (ΔT , ProB) und DRB13 (ΔT , ProB*) (5.1.2) mit dem des Wildtypstammes JH642 und dem der $\Delta proHJ$ -Mutante JSB8 verglichen. Die Mutanten DRB2 (ProB*), DRB12 (ΔT , ProB) und DRB13 (ΔT , ProB*) wiesen neben der Aminosäure-Substitution im flexiblen Loop bzw. der T-Box-Deletion eine Deletion des *proHJ*-Operons auf, um eine Beeinflussung der Testergebnisse durch das osmotisch induzierte ProJ zu vermeiden. Alle Stämme wurden unter isoosmolaren Bedingungen und unter Hochsalzbedingungen (1,2 M NaCl) getestet.

Der Wildtypstamm JH642 war erwartungsgemäß in der Lage sich an Hochsalzbedingungen anzupassen, während die Deletion des *proHJ*-Operons im Stamm JSB8 zu einem osmotisch sensitiven Phänotyp führte (Abb. 10) (Brill *et al.*, 2011 b). Die ProB*-Mutante DRB2 zeigte im Gegensatz zur $\Delta proHJ$ -Mutante JSB8 eine verminderte Osmosensitivität (Abb. 10). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass der Aminosäure-Austausch im flexiblen Loop von ProB zu einer Verminderung der allosterischen Regulation durch Prolin führt. Für die ProJ*-Mutante DRB3 konnte hingegen im Vergleich zum Wildtypstamm JH642 eine erhöhte Osmosensitivität beobachtet werden (Abb. 10). Hier bewirkt der Aminosäure-Austausch in ProJ eine Erhöhung der allosterischen Regulation durch Prolin.

Die mit dem Wildtyp-ProB kombinierte T-Box-Mutante DRB12 zeigte im Vergleich zur $\Delta proHJ$ -Mutante JSB8 durch den Verlust der Regulation des *proB*-Gens auf transkriptioneller Ebene ebenfalls eine verminderte Osmosensitivität (Abb. 10). Sie erreichte mit ihrem Wachstum das gleiche Level wie die ProB*-Mutante DRB2 (Abb. 10). Dies verdeutlicht, dass die T-Box-Regulation auf transkriptioneller Ebene und die Feedback-Regulation durch Prolin auf Proteinebene einen gleich hohen Anteil an der Regulation des anabolen Prolinbiosyntheseweges besitzen. Die mit dem ProB* kombinierte T-Box-Mutante DRB13 zeigte im Vergleich zu DRB12 (ΔT , ProB) eine noch größere Abnahme der Osmosensitivität (Abb. 10), da hier zum einen die Regulation des *proB*-Gens auf transkriptioneller Ebene fehlt. Zum anderen

bewirkt der Aminosäure-Austausch im flexiblen Loop von ProB eine Verminderung der allosterischen Regulation durch Prolin.

Unter isoosmolaren Bedingungen zeigten alle untersuchten Stämme ein ähnliches Wachstum (Daten nicht gezeigt).

Die hier gezeigten Ergebnisse beweisen, dass der Aminosäure-Austausch im flexiblen Loop der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ einen entscheidenden Einfluss auf die Osmosensitivität der untersuchten Stämme ausübt. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Aminosäureaustausch in ProB zu einer Verminderung der allosterischen Regulation durch Prolin zu führen scheint, welche eine erhöhte Osmotoleranz mit sich bringt. Der Austausch in ProJ bewirkt hingegen die Feedback-Regulation dieses zuvor nicht allosterisch regulierten Proteins und geht mit einer verminderten Osmotoleranz einher. Folglich lassen sich ProB und ProJ durch den Austausch einer einzigen Aminosäure ineinander umwandeln.

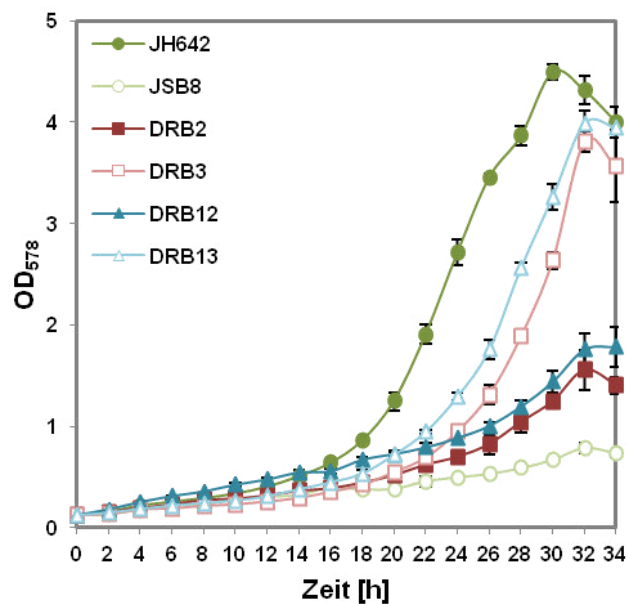


Abb. 10: Wachstum der *B. subtilis* Feedback- und T-Box-Deletionsstämme unter hochosmolaren Bedingungen

B. subtilis-Wildtypstamm JH642 und seine Derivate JSB8 ($\Delta proHJ$), DRB2 (ProB:E142R, $\Delta proHJ$), DRB3 (ProJ:R146E), DRB12 (ΔT -Box, ProB:E142R, $\Delta proHJ$) und DRB13 (ΔT -Box, ProJ:R146E, $\Delta proHJ$) wurden in SMM + 1,2 M NaCl kultiviert. Die OD₅₇₈ wurde über einen Zeitraum von 34 Stunden alle zwei Stunden photometrisch bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Wachstumsexperiment, dessen Daten in einem unabhängigen Experiment bestätigt werden konnten. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen berechnet. Kontroll- und Ausgangsstämme sind in grün, Feedback-Mutanten sind in rot und T-Box-Mutanten sind in blau dargestellt.

5.1.4 Einfluss der Aminosäure-Substitution in ProB und ProJ auf die intrazelluläre Prolinakkumulation in *B. subtilis*

Um zu untersuchen, ob der Aminosäure-Austausch im flexiblen Loop der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ neben einer Veränderung in der Salztoleranz auch einen Effekt auf die Prolinakkumulation in der Zelle ausübt, wurde der interne Prolingehalt der Stämme DRB2 (ProB), DRB3 (ProB*), DRB12 (ΔT , ProB) und DRB13 (ΔT , ProB*) unter isoosmolaren und unter Hochsalzbedingungen (1,2 M NaCl) mit dem des *B. subtilis* Wildtypstammes JH642 und dem der $\Delta proHJ$ -Mutante JSB8 verglichen.

Erwartungsgemäß war die $\Delta proHJ$ -Mutante JSB8 unter Hochsalzbedingungen mit einem internen Pool von rund 50 mM nicht dazu in der Lage Prolin in hohen Konzentrationen als osmotische Schutzsubstanz zu synthetisieren (Abb. 11 B). Vergleichend dazu akkumulierte der Wildtypstamm JH642 mehr als 400 mM Prolin (Abb. 11 B). Für Die ProB*-Mutante DRB2 konnte im Vergleich zur $\Delta proHJ$ -Mutante JSB8 eine Verdopplung der Prolin-Akkumulation beobachtet werden (Abb. 11 B), da der Aminosäure-Austausch im flexiblen Loop von ProB zu einer Verminderung der Feedback-Inhibition durch Prolin führt. Die ProJ*-Mutante DRB3 zeigte hingegen mit 300 mM internem Prolin eine Verminderung der intrazellulären Prolinmenge vergleichend zum Wildtypstamm JH642 (Abb. 11 B). Hier bewirkt der Aminosäure-Austausch in ProJ eine Erhöhung der allosterischen Regulation durch Prolin. Hohe interne Prolinkonzentrationen führen folglich zu einer Inhibition der Prolinsynthese.

Die mit dem Wildtyp-ProB kombinierte T-Box-Mutante DRB12 zeigte mit im Vergleich zur $\Delta proHJ$ -Mutante JSB8 durch den Verlust der Regulation des *proB*-Gens auf transkriptioneller Ebene eine Verdopplung der internen Prolinmenge (Abb. 11 B). Die mit dem ProB* kombinierte T-Box-Mutante DRB13 erlaubte vergleichend zur $\Delta proHJ$ -Mutante JSB8 sogar eine fünffach höhere Prolin-Akkumulation (Abb. 11 B), da hier zum einen die Regulation des *proB*-Gens auf transkriptioneller Ebene entfällt und zum anderen der Aminosäure-Austausch im flexiblen Loop von ProB eine Verminderung der allosterischen Regulation durch Prolin bewirkt. Die Prolinakkumulation in den einzelnen Mutanten steht in deutlichem Zusammenhang mit dem Wachstumsphänotyp dieser Stämme unter Hochsalzbedingungen. Je größer der interne Prolinpool ist desto niedriger ist die Osmosensitivität (Abb. 11 A, 11 B).

Unter isoosmolaren Bedingungen zeigen alle untersuchten Stämme erwartungsgemäß einen niedrigen internen Prolinpool von 10 bis 20 mM (Daten nicht gezeigt).

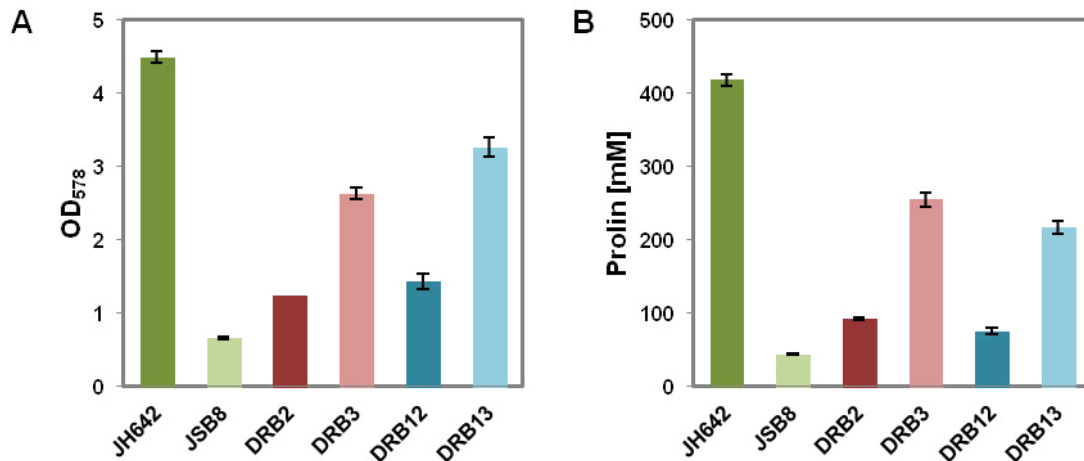


Abb. 11: Korrelation zwischen Wachstum osmotisch gestresster *B. subtilis*-Zellen und der Menge an intrazellulär akkumuliertem Prolin

(A) Der *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 und seine Derivate JSB8 ($\Delta proHJ$), DRB2 (ProB:E142R, $\Delta proHJ$), DRB3 (ProJ:R146E), DRB12 (ΔT -Box, ProB:E142R, $\Delta proHJ$) und DRB13 (ΔT -Box, ProJ:R146E, $\Delta proHJ$) wurden in SMM + 1,2 M NaCl kultiviert. Der Wachstumsertrag wurde nach 30 h photometrisch (OD₅₇₈) bestimmt. (B) Die Stämme wurden bis zu einer OD₅₇₈ von 1,8 - 2 in SMM + 1,2 M NaCl angezogen. Die Bestimmung des Prolingehaltes erfolgte nach der von Bates *et al.* (1973) beschriebenen Methode (4.4.2). (A-B) Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen berechnet. Kontroll- und Ausgangsstämme sind in grün, Feedback-Mutanten sind in rot und T-Box-Mutanten sind in blau dargestellt.

Die hier gezeigten Ergebnisse beweisen, dass der Aminosäure-Austausch im flexiblen Loop der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ einen entscheidenden Einfluss auf die Fähigkeit zur Akkumulation von Prolin in den untersuchten Mutanten ausübt. Die interne Prolinmenge steht hierbei in Korrelation mit der Osmotoleranz dieser Stämme. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Aminosäure-Austausch in ProB zu einer Erhöhung der Fähigkeit zur Prolinakkumulation führt, während der Austausch in ProJ die Verminderung der Prolinakkumulation bewirkt.

5.1.5 Einfluss der Aminosäure-Substitution in ProB auf die allosterischen Eigenschaften des Enzyms

In den vorangegangenen Versuchen (5.1.3 und 5.1.4) konnte durch die physiologische Charakterisierung von *B. subtilis*-Mutanten bereits gezeigt werden, dass die Aminosäure-Substitutionen im flexiblen Loop der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ sowohl einen Einfluss auf die intrazelluläre Prolinakkumulation als auch auf die Osmotoleranz haben. Es ist naheliegend, dass die Veränderung von Prolinakkumulation und Osmotoleranz auf eine veränderte allosterische Regulation der ProB- und ProJ-Enzyme durch Prolin zurückzuführen ist. Um einen direkten Beweis für die Hypothese zu erbringen, wurde die Aktivität der γ -Glutamyl-Kinase ProB und deren Feedback-Inhibition durch Prolin in einem Enzymassay untersucht.

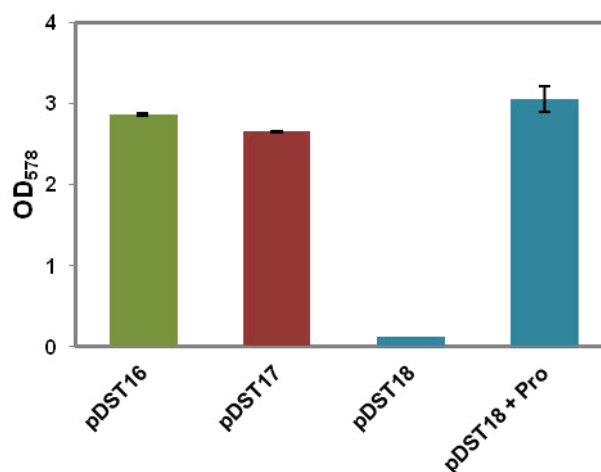


Abb. 12: Wachstum der *E. coli* CSH26-Derivate mit pDST16, pDST17 und pDST18 in Minimalmedium

Die *E. coli* CSH26-Derivate ($\Delta proBA$) mit pDST16 (pBluescript mit *proBA*), pDST17 (pBluescript mit *proB*^{*}A) und pDST18 (pBluescript leer) wurden in M63-Minimalmedium ohne Prolin kultiviert. Der Wachstumsertrag wurde nach 6 Stunden photometrisch (OD₅₇₈) bestimmt. Der Kontrollstamm mit pDST18 wurde zusätzlich mit 10 mM Prolin kultiviert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen berechnet.

Für die Bestimmung der Aktivität der γ -Glutamat-Kinase ProB aus *B. subtilis* wurde der *E. coli*-Stamm CSH26 ($\Delta proBA$) genutzt, welcher Plasmid-vermittelt (pBluescript) mit dem Wildtyp-*proBA*-Operon (pDST16) bzw. dem mutierten *proB*^{*}A-Operon (pDST17) aus *B. subtilis* komplementiert wurde. Die mit pDST16 und pDST17 komplementierten Stämme zeigten keine Prolin-Auxotrophie und waren dazu

befähigt in Minimalmedium ohne Prolin zu wachsen (Abb. 12). Als Kontrolle wurde ein CSH26-Stamm mitgeführt, welcher ein leeres pBluescript-Plasmid (pDST18) enthält. Dieser Stamm zeigte in Minimalmedium ohne die Zugabe von Prolin aufgrund seines Prolin-auxotrophen Phänotyps kein Wachstum (Abb. 12). Durch Zugabe von Prolin in das Medium konnte die Prolin-Auxotrophie für diesen Stamm ausgeglichen werden (Abb. 12).

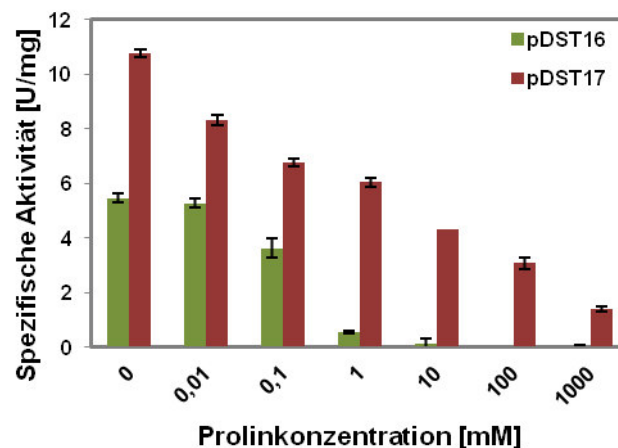


Abb. 13: Feedback-Inhibition der Wildtyp- γ -Glutamyl-Kinase ProB und der mutierten Variante ProB* (E142R) aus *B. subtilis* in An- und Abwesenheit von Prolin

Der γ -Glutamyl-Kinase-/ γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase-gekoppelte Aktivitäts-Assay wurde mit Zellextrakten der *E. coli* CSH26-Derivate ($\Delta proBA$) mit pDST16 (pBluescript mit *proBA*) und pDST17 (pBluescript mit *proB*^{*}A) durchgeführt, welche die Wildtyp-Variante oder die mutierte Variante der γ -Glutamyl-Kinase ProB aus *B. subtilis* enthielten. Die Stämme wurden in Abwesenheit und in Anwesenheit von 0,01 mM; 0,1 mM; 1,0 mM; 10 mM; 100 mM und 1000 mM Prolin untersucht. Die Ergebnisse sind als spezifische Aktivität [U/mg] dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei technischen Parallelen berechnet.

Für den Enzymassay wurden zellfreie Extrakte der *E. coli* CSH26-Derivate mit pDST16, pDST17 und pDST18 genutzt, um die γ -Glutamyl-Kinase-/ γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase-gekoppelte Aktivität bei verschiedenen Prolin-Konzentrationen zu messen (4.4.4). Die Wildtyp- γ -Glutamyl-Kinase ProB (E142) zeigte in Abwesenheit von Prolin eine spezifische Aktivität von 5,47 U/mg (Abb. 13). Das Wildtyp-Protein war wie erwartet durch eine sehr hohe Sensitivität gegenüber Prolin-vermittelter Feedback-Inhibition gekennzeichnet. Bereits geringe Prolin-Konzentrationen von 1 mM hemmten die Enzymaktivität um mehr als 90 % (Abb. 13). In Anwesenheit von 10 mM Prolin war das Enzym inaktiv (Abb. 13). Das mutierte

ProB* (E142R) aus *B. subtilis* zeigte in Abwesenheit des Inhibitors Prolin mit 10,78 U/mg eine fast doppelt so hohe spezifische Aktivität wie das Wildtypprotein (Abb. 13). Folglich wird Glutamat durch das mutierte Enzym schneller umgesetzt als durch das Wildtypenzym. Zudem war ProB* vergleichend zum Wildtypprotein durch eine deutlich geringere Feedback-Inhibition durch Prolin gekennzeichnet. Bei Konzentrationen von 1 mM Prolin sank die Enzymaktivität um 45 % ab (Abb. 13). Selbst in Anwesenheit von 1000 mM Prolin konnte noch eine Enzymaktivität von mehr als 10 % nachgewiesen werden (Abb. 13). Für den CSH26-Stamm mit dem leeren pBluescript-Plasmid (pDST18) konnte keine Hintergrundaktivität detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

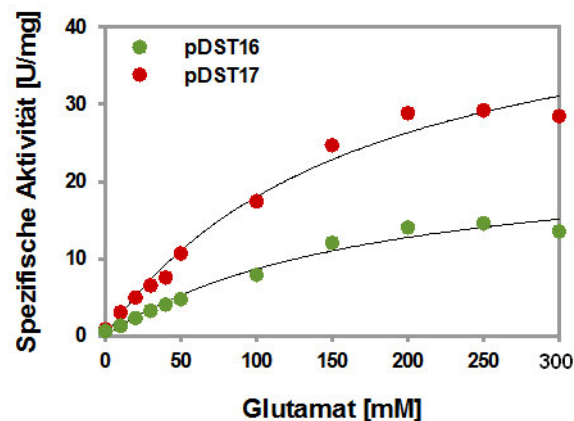


Abb. 14: Aktivität der Wildtyp- γ -Glutamyl-Kinase ProB und der mutierten Variante ProB* (E142R) aus *B. subtilis* in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Substrates Glutamat

Der γ -Glutamyl-Kinase- γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase-gekoppelte Aktivitäts-Assay wurde mit Zellextrakten der Prolin-auxotrophen *E. coli* CSH26-Derivate ($\Delta proBA$) mit pDST16 (pBluescript mit *proBA*) und pDST17 (pBluescript mit *proB**) durchgeführt, welche die Wildtyp-Variante oder die mutierte Variante der γ -Glutamyl-Kinase ProB aus *B. subtilis* enthielten. Die Stämme wurden in Anwesenheit von 0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM und 300 mM Glutamat untersucht. Die Ergebnisse sind als spezifische Aktivität [U/mg] dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei technischen Parallelen berechnet.

Desweiteren wurde der Einfluss der Konzentration des Substrates Glutamat auf die Enzymaktivität untersucht (Abb. 14). Die Wildtyp- γ -Glutamyl-Kinase ProB und die mutierte Variante ProB* zeigten hierbei mit steigender Substratkonzentration eine zunehmende spezifische Aktivität (Abb. 14). Das Wildtypenzym erreicht eine maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) von 24 ± 2 U/mg. Hierbei handelt es sich

um die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion, die bei Substratsättigung erreicht wird. Das mutierte ProB*-Enzym zeigt vergleichend zum Wildtypprotein mit 49 ± 3 U/mg eine doppelt so hohe maximale Umsatzgeschwindigkeit. Das bedeutet, dass die mutierte Variante das Substrat Glutamat deutlich schneller umsetzen kann als die Wildtyp-Variante des Proteins. Der kinetische Parameter K_m unterscheidet sich hingegen nicht für ProB und ProB* (Abb. 14). Das Wildtypprotein ProB zeigt einen K_m -Wert von 178 ± 29 mM und das mutierte ProB* weist einen K_m -Wert von 170 ± 23 mM auf. Folglich ist die Affinität zwischen dem Substrat Glutamat und dem Wildtyp-ProB bzw. dem mutierten ProB gleich hoch.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Aminosäure-Austausch im flexiblen Loop der γ -Glutamyl-Kinase ProB zu einer deutlichen Reduktion der Feedback-Inhibition des Enzyms durch Prolin führt und eine schnellere Umsetzung des Substrates Glutamat hervorruft. Die Affinität von Glutamat zum aktiven Zentrum von ProB und ProB* ist hierbei jedoch nicht betroffen.

5.1.6 *In silico*-Strukturanalyse der γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aus *B. subtilis* sowie deren mutierter Varianten

Die Enzymfamilie der γ -Glutamyl-Kinasen weist eine sehr hohe Sequenz- und Strukturhomologie auf. Es stehen Kristallstrukturen für die bakteriellen Enzyme von *Escherichia coli* (Protein Data Bank [PDB] Code 2J5V und 2J5V) (Marco-Marin *et al.*, 2007), *Campylobacter jejuni* (PDB Code 2AKO) und *Burkholderia thailandensis* (PDB Code 2Q1T) zur Verfügung. Die γ -Glutamyl-Kinase aus *E. coli* ist hierbei die am besten untersuchte. Sie bildet eine 367 Aminosäuren lange Kette, welche sich in eine N-terminale Kinase-Domäne, die für die katalytische Reaktion und die Prolin-Inhibition verantwortlich ist, und eine C-terminale RNA-Bindedomäne unterscheiden lässt. Die funktionelle Einheit des *E. coli*-Enzyms ist ein Tetramer bestehend aus zwei Dimeren. Bisher wurden γ -Glutamyl-Kinasen mit Glutamat (PDB Code 2J5T) (Marco-Marin *et al.*, 2007), γ -Glutamyl-Phosphat (PDB Code 2J5V) (Marco-Marin *et al.*, 2007) und ADP (PDB Code 2AKO) kristallisiert. Versuche dieses Enzym mit Prolin zu kristallisieren waren bisher ohne Erfolg. Jedoch konnte mit Hilfe von Kinetik-Assays, gezielter Mutagenese, Struktur-Aktivitäts-Analysen und Binde-Kalkulationen die Bindestelle für Prolin in der

dreidimensionalen Struktur der γ -Glutamyl-Kinase von *E. coli* (vgl. Abb. 4 A) und *C. jejuni* (vgl. Abb. 4 B) identifiziert werden (Perez-Arellano *et al.*, 2010 b). Die Bindestelle des Inhibitors Prolin und die des Substrates Glutamat überlappen teilweise im aktiven Zentrum des Enzyms (Perez-Arellano *et al.*, 2010 b) (vgl. Abb. 4). Die Bindung von Prolin und Glutamat an die γ -Glutamyl-Kinase ist durch einen 16 Aminosäuren langen flexiblen Loop moduliert, welcher das β -Faltblatt 4 und die α -Helix A miteinander verbindet (Perez-Arellano *et al.*, 2010 b) (vgl. Abb. 4).

Durch die Verwendung des internetbasierten Programms SWISS-Model wurden ausgehend von der mit Glutamat komplexierten *E. coli*-Kristallstruktur (PDB Code 2J5T) *in silico*-Modelle für die γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aus *B. subtilis* erstellt. Desweiteren wurden Modelle für ProB* und ProJ* angefertigt, welche eine Aminosäure-Substitution im flexiblen Loop des Enzyms aufweisen (5.1.2). Die *in silico*-Modelle für ProB und ProB* sowie ProJ und ProJ* sind in der Abbildung 15 als Overlay dargestellt. Die Wildtyp- γ -Glutamyl-Kinasen sowie deren mutierte Varianten zeigen folgendes Bindungsschema für das Substrat Glutamat: Die α -Carboxylgruppe von Glutamat interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen mit der Aminogruppe der Aminosäuren Glycin (G50), Alanin (A51) und Valin (V52). Desweiteren bindet die γ -Carboxylgruppe von Glutamat an die Aminogruppe der Aminosäure Serin (S49) (Abb. 15 A, 15 B). Die Aminosäure-Reste S49, G50 und A51 sind hierbei in einem Loop lokalisiert, welcher das β -Faltblatt 2 und die α -Helix B miteinander verbindet. Die Aminosäure V52 kann der α -Helix B zugeordnet werden (Abb. 15 A, 15 B). Desweiteren interagiert die α -Aminogruppe des Substrates Glutamat über Wasserstoffbrückenbindungen mit der Carboxylgruppe der Aminosäurereste Asparagin (N133) und Asparaginsäure (D136). Diese befinden sich im N-terminalen Segment des flexiblen β 4- α E-Loops (Abb. 15 A, 15 B). Die Bindestelle des Substrates Glutamat und die des Inhibitors Prolin überlappen teilweise im aktiven Zentrum des Enzyms (vgl. Abb. 4). Beide Moleküle liegen hierbei in einer offenen Einbuchtung (Abb. 15 C, 15 D). Die α -Aminogruppe von Prolin ist zum N-terminalen Teil des flexiblen β 4- α E-Loops hin orientiert und bildet wie Glutamat Wasserstoffbrückenbindungen zu N133 und D136 aus.

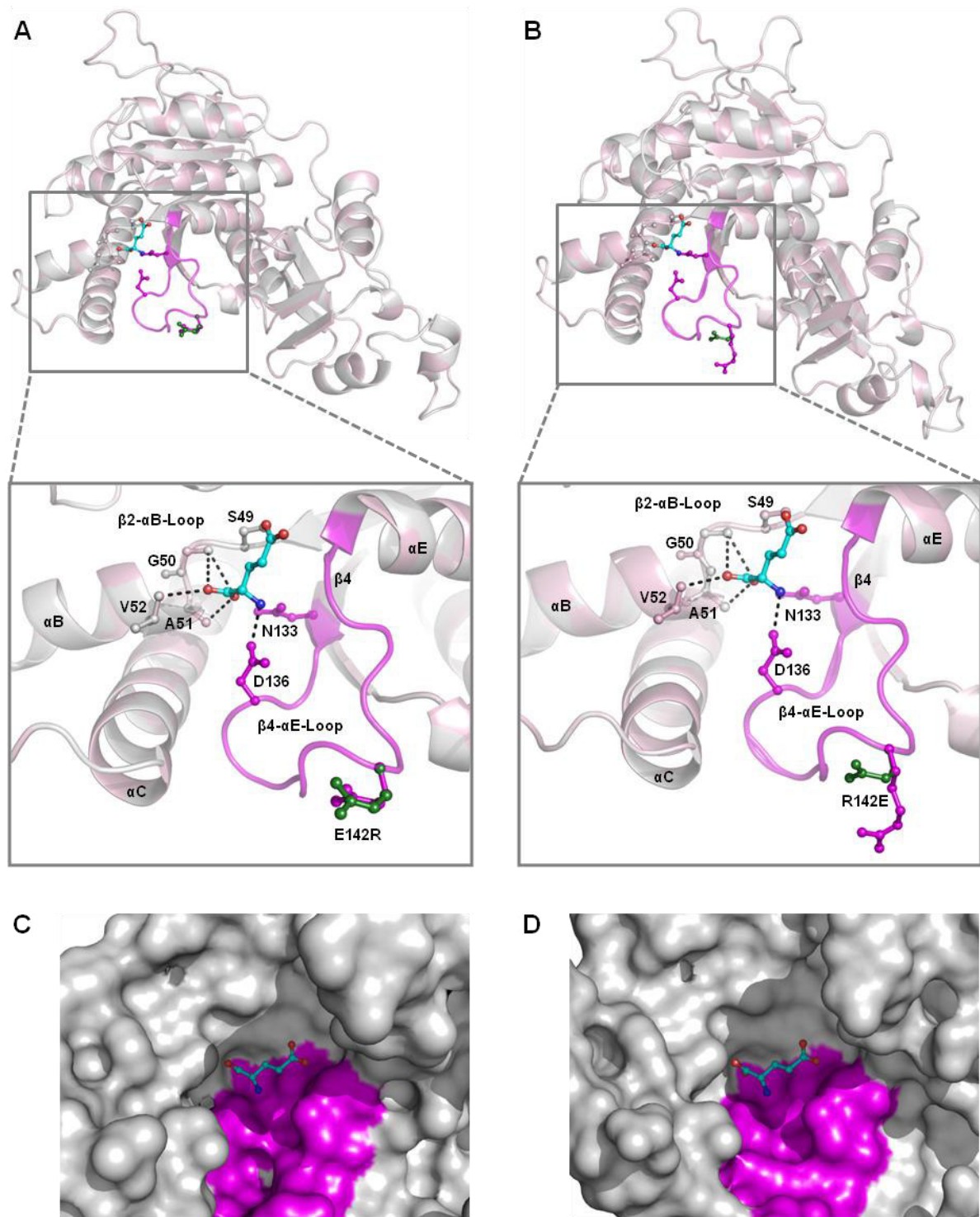


Abb. 15: *In silico*-Strukturmodelle der γ-Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aus *B. subtilis*

(A-B) Die *in silico*-Modelle für ProB, ProB*, ProJ und ProJ* wurden auf Grundlage der Kristallstruktur der γ-Glutamyl-Kinase aus *E. coli* (PDB Code 2J5T) erstellt. ProB und ProB* (A) sowie ProJ und ProJ* (B) sind als Overlay gezeigt. Die Wildtyp-Struktur ist jeweils in grau und die Mutante in rosa dargestellt. Der flexible β4-αE-Loop ist pink markiert. Die Wildtyp-Aminosäure an der Position 142 von ProB bzw. an der Position 146 von ProJ ist ebenfalls pink dargestellt. Die entsprechende ausgetauschte Aminosäure im mutierten Protein ist in grün gezeigt. Das Substrat Glutamat ist in blau dargestellt. Wasserstoffbrücken-Bindungen sind als gestrichelte Linien eingezeichnet. Die wichtigsten Strukturelemente sind beschriftet. (C-D) Die Oberflächenstruktur der *in silico*-Modelle der γ-Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ ist gezeigt. Glutamat bindet in einer tiefen Einbuchtung im aktiven Zentrum der Moleküle und ist in blau dargestellt. Der flexible β4-αE-Loop ist pink markiert.

Die α -Carboxylgruppe des Prolins bindet ebenfalls wie Glutamat an den Aminosäurerest V52. Folglich liegen die α -Aminogruppe und die α -Carboxylgruppen des Substrates Glutamats und des Inhibitors Prolin in gleicher Orientierung im aktiven Zentrum der γ -Glutamyl-Kinase (vgl. Abb. 4).

Die in den vorangegangenen Versuchen (5.1.1 - 5.1.5) untersuchten Aminosäure-Substitutionen in ProB (E142R) und ProJ (R146E) sind im mittleren Teil des flexiblen β 4- α E-Loops lokalisiert und weisen eine exponierte Lage auf (Abb. 15 A, 15 B). Die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante in der Ausrichtung der Aminosäuren Glutamat und Arginin sind deutlich zu erkennen (Abb. 15 A, 15 B). So ist die Seitenkette der Aminosäure Glutamat (ProB, ProJ*) dicht am flexiblen Loop orientiert, während die Seitenkette des Arginins (ProB*, ProJ) weit aus dem flexiblen Loop heraus ragt (Abb. 15 A, 15 B). Der Aminosäure-Austausch im flexiblen Loop von ProB und ProJ betrifft keine der Aminosäuren, welche direkt an Glutamat oder Prolin binden. Da die Bindetasche von Prolin und Glutamat überlappt und der β 4- α E-Loop flexibel ist, scheint es naheliegend, dass die γ -Glutamyl-Kinase ihre Interaktion mit dem Substrat und dem Inhibitor durch eine Konformationsänderung moduliert, an welcher der flexible Loop beteiligt ist. So könnte der Austausch der negativ geladenen Aminosäure Glutamat gegen die positiv geladene Aminosäure Arginin die Loop-Konformation ändern und indirekt die Ligandenbindung beeinflussen.

5.2 Umgehung der *proA*-Deletion im Prolinbiosyntheseweg von *B. subtilis*

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit Prolin-Suppressormutanten, welche in der Lage sind durch die flexible Anpassung ihres Stoffwechsels einen Defekt im Prolinbiosyntheseweg zu umgehen und einen neuen Weg der Osmoadaption zu nutzen. Die Prolinbiosynthese in *B. subtilis* kann über zwei Wege realisiert werden. Der ProB-ProA-Prol-Weg, dient der Bereitstellung von Prolin für anabole Zwecke, während der ProJ-ProA-ProH-Weg für die Synthese von Prolin als osmotische Schutzsubstanz verantwortlich ist (Abb. 16 A) (Brill *et al.*, 2011 a; Brill *et al.*, 2011 b). Bei den γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ sowie den Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktasen Prol und ProH handelt es sich um Isoenzyme.

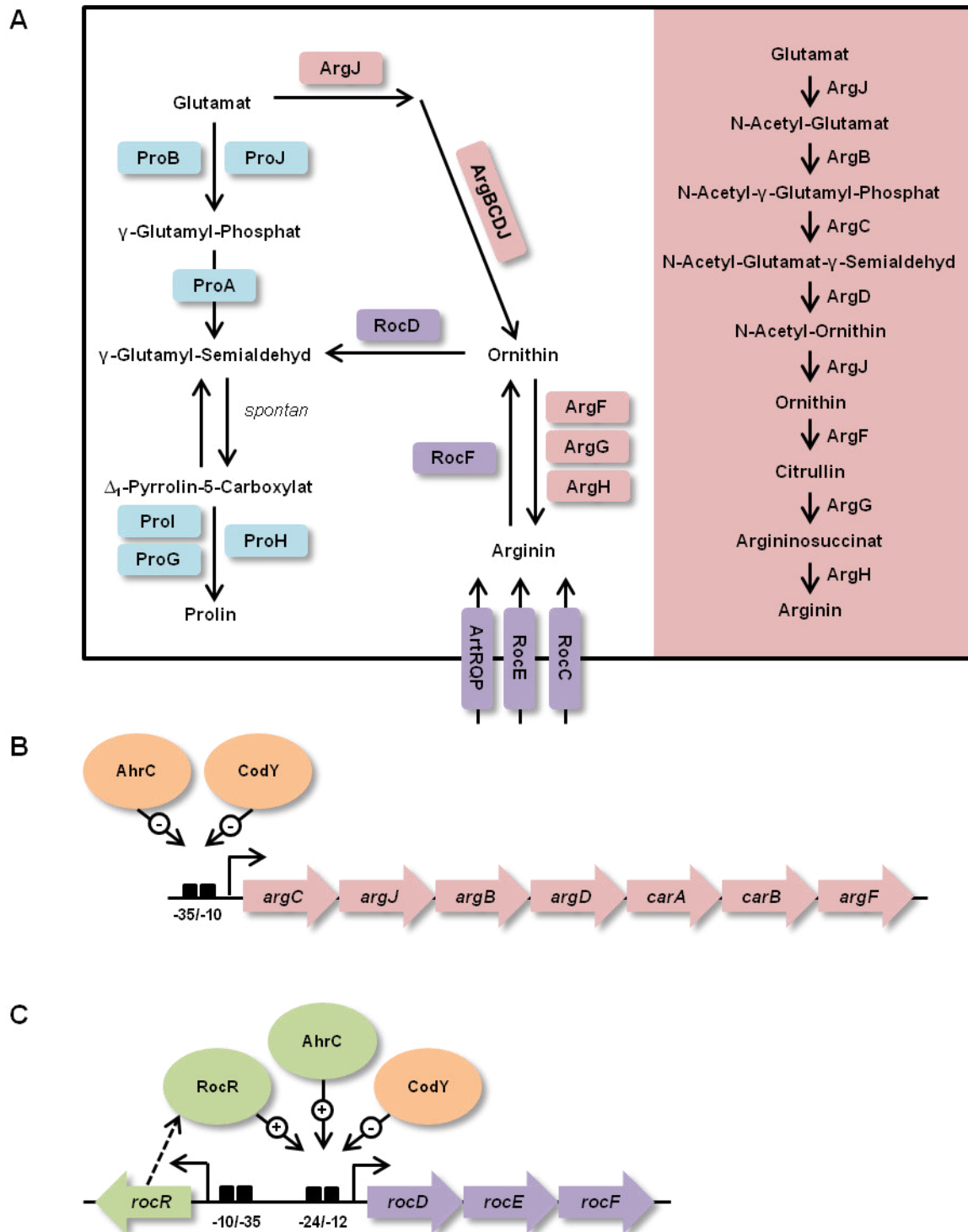


Abb. 16: Biosynthesewege für die anabole und osmoadaptive Prolin-Produktion in *B. subtilis* und ihre Verbindung zum Arginin-Anabolismus und Arginin-Katabolismus

(A) Die Prolinbiosynthese ausgehend von Glutamat wird durch drei Enzyme katalysiert: Die γ -Glutamyl-Kinase (ProB, ProJ), die γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase (ProA) und die Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase (Prol, ProG, ProH). Der Prolinbiosyntheseweg ist über die Ornithin-N-Acetyltransferase ArgJ mit dem Arginin-Anabolismus und über die Ornithin-Aminotransferase RocD mit dem Arginin-Katabolismus vernetzt. (B) Das *argCJBD-carAB-argF*-Operon codiert für Proteine des Arginin-Anabolismus und wird durch die Transkriptions-Repressoren AhrC und CodY reguliert. (C) Das *rocDEF*-Operon codiert für Proteine des Arginin-Katabolismus und wird durch die Transkriptions-Aktivatoren RocR und AhrC sowie den Transkriptions-Repressor CodY reguliert.

Diese sind dazu in der Lage die Funktion des jeweils anderen Enzyms zu übernehmen (Belitsky *et al.*, 2001). Der anabole und der osmoadaptive Prolinbiosyntheseweg sind über die γ -Glutamylphosphat-Reduktase ProA miteinander verbunden (Abb. 16 A) (Brill *et al.*, 2011 b).

Da kein paraloges Protein zu ProA existiert, ist zu erwarten, dass die Deletion dieses Enzyms zur Ausbildung eines stark Prolin-auxotrophen Phänotyps führt. Entgegen dieser Vermutung zeigen *proBA*- bzw. *proA*-Deletionsmutanten Mikrokolonien auf SMM-Agarplatten ohne Prolin und die vereinzelte Bildung von schneller wachsenden Prolin-Suppressormutanten ist zu beobachten. Diese Mutanten tragen entweder Mutationen im *rocR*-Gen oder im *rocDEF*-Promotor-Bereich (Zaprasis *et al.*, 2014). Die *rocDEF*-Operon codiert für Gene, die am Arginin-Abbau beteiligt sind (Gardan *et al.*, 1995; Ali *et al.*, 2003) (Abb. 16 A, 16 C). RocR ist der Transkriptionsaktivator des *rocDEF*-Operons (Calogero *et al.*, 1994; Gardan *et al.*, 1997) (Abb. 16 C). Mutationen in diesen beiden Genregionen führen zu einer verstärkten *rocDEF*-Transkription und folglich zu erhöhten intrazellulären Mengen des Proteins RocD-Ornithin-Transferase. Dieses Enzym synthetisiert das gleiche Produkt wie die γ -Glutamylphosphat-Reduktase ProA (Abb. 16 A). Dementsprechend kann eine *proA*-Deletion im Prolinbiosyntheseweg umgangen werden. Diese Prolin-Suppressormutanten zeigen einen Prolin-prototrophen Phänotyp (Pro⁺) und weisen unter nicht osmotischen Bedingungen hinsichtlich ihres Wachstums und intrazellulär angehäuften Prolins den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp auf. Sie sind jedoch nicht in der Lage osmoprotektive Prolin-Level via *de novo*-Synthese zu erreichen und können folglich ohne die externe Prolinzugabe nicht in Minimalmedium mit 1,2 M NaCl wachsen (Zaprasis *et al.*, 2014).

Auf der Grundlage dieser Vorarbeiten befasst sich der folgende Abschnitt mit der Isolation von Suppressormutanten, welche dazu in der Lage sind osmoprotektive Prolinmengen zu synthetisieren und folglich unter Hochsalzbedingungen wachsen können.

5.2.1 Isolierung von Pro⁺-Suppressormutanten

Für die folgenden Untersuchungen wurden drei verschiedene Ausgangsstämme genutzt. Die *proBA*-Deletionsmutante GWB120 weist zusätzlich eine

Pro⁺-Suppressormutation im *rocDEF*-Promotor auf. Bei dem Stamm GWB128 handelt es sich ebenfalls um eine *proBA*-Deletionsmutante, welche eine Pro⁺-Suppressormutation im *rocR*-Gen besitzt, welche zu einem Aminosäure-Austausch (L250H) im Regulator-Protein RocR führt. Der dritte Stamm DRB4 ist eine *proA*-Deletionsmutante ohne weitere Mutationen.

Die Pro⁺-Suppressormutanten GWB120 und GWB128 zeigten in Minimalmedium Wildtypwachstum (Abb. 17 A). Sie waren jedoch nicht dazu in der Lage auch unter Hochsalzbedingungen in Minimalmedium mit 1,2 M NaCl zu wachsen (Daten nicht gezeigt). Die *proA*-Deletionsmutante DRB4 wies im Vergleich zum Wildtypstamm unter isoosmolaren Bedingungen ein extrem vermindertes Wachstum auf (Abb. 17 A) und war ebenfalls nicht dazu in der Lage unter Hochsalzbedingungen zu wachsen (Daten nicht gezeigt).

Kultivierte man die Stämme GWB120 und GWB128 hingegen in flüssigem Minimalmedium ohne Prolin bei einer geringeren Salzkonzentration von 0,8 M NaCl, so konnte ein geringes Wachstum beobachtet werden (Abb. 17 B). Das gleiche Bild, wenn auch weniger ausgeprägt, ergab sich für die *proA*-Deletionsmutante DRB4 (Abb. 17 B).

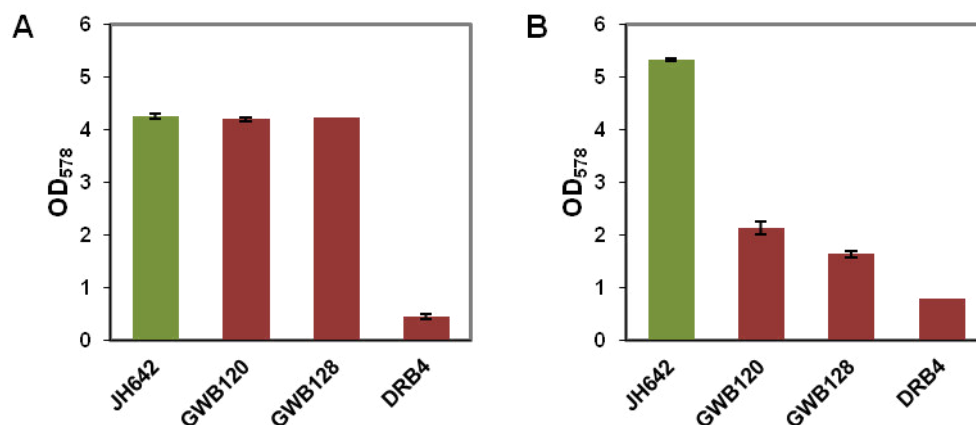


Abb. 17: Wachstum der *B. subtilis proBA*- bzw. *proA*-Deletionsstämme GWB120, GWB128 und DRB4 in SMM-Medium (A) und SMM-Medium + 0,8 M NaCl (B)

(A) Der *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 (grün) und dessen Derivate (rot) GWB120 ($\Delta proBA$; *rocDEF*^{*}), GWB128 ($\Delta proBA$; *rocR*^{*}) und DRB4 ($\Delta proA$) wurden in SMM kultiviert. Der Wachstumsertrag wurde nach 16 h photometrisch (OD₅₇₈) bestimmt. (B) Der *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 und dessen Derivate GWB120, GWB128 und DRB4 wurden in SMM + 0,8 M NaCl kultiviert. Der Wachstumsertrag wurde nach 24 h photometrisch (OD₅₇₈) bestimmt. Alle Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen berechnet.

Noch deutlicher konnte dieses Phänomen auf festem Minimalmedium beobachtet werden. Hier zeigten die Stämme GWB120 und GWB128 erneut Wildtypwachstum (Abb. 18 A). Der Stamm DRB4 war dazu in der Lage mit der gleichen Effizienz wie der Wildtypstamm Kolonien auf SMM-Agarplatten zu bilden. Jedoch zeigte der Stamm deutlich kleinere Kolonien als der Wildtyp (Abb. 18 A). Auffällig war hierbei die vereinzelte Bildung von größeren, schneller wachsenden Kolonien (Abb. 18 A, markiert mit einem weißen Pfeil).

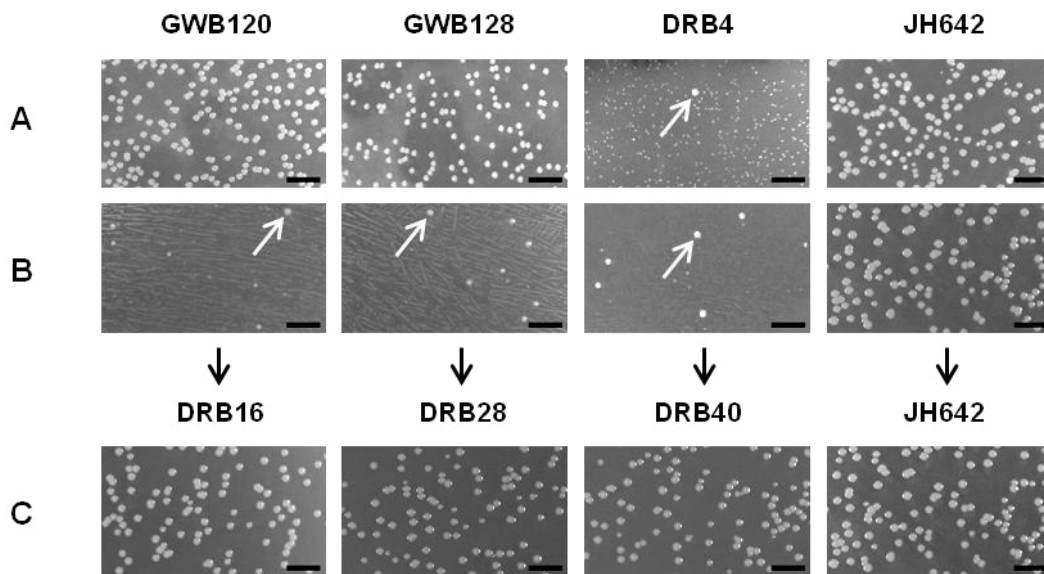


Abb. 18: Wachstum verschiedener *B. subtilis*-Deletionsstämme auf Minimal-Agarplatten

Der *B. subtilis* Wildtypstamm JH642 und dessen Derivate GWB120 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$), GWB128 ($\Delta proBA$, $rocR^*$) und DRB4 ($\Delta proA$) wurden bis zur stationären Phase in SMM oder SMM + 0,8 M NaCl angezogen. 100 μ l der verdünnten Kulturen (SMM: 10^{-1} ; SMM + 0,8 M NaCl: 10^{-5}) wurden auf SMM-Agarplatten (A) oder SMM-Agarplatten mit 0,8 M NaCl (B) ausplattiert und für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Der weiße Pfeil kennzeichnet beispielhaft Pro^+ -Suppressormutanten. Die Pro^+ -Suppressormutanten DRB16 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$), DRB28 ($\Delta proBA$, $rocR^*$) und DRB40 ($\Delta proA$) wurden isoliert und ebenfalls bis zur stationären Phase in SMM + 0,8 M NaCl angezogen. 100 μ l der verdünnten Kulturen (10^{-5}) wurden auf SMM-Agarplatten mit 0,8 M NaCl replattiert (C). Längenstandard: 5 mm.

Die *proBA*- bzw. *proA*-Deletionsstämme GWB120, GWB128 und DRB4 waren ebenso dazu in der Lage auf SMM-Agarplatten mit 0,8 M NaCl zu wachsen (Abb. 18 B). Die Kolonien aller drei Ausgangsstämme waren im Vergleich zum Wildtypstamm sehr klein (Abb. 18 B). Unter Salzbedingungen wiesen alle drei *proBA*- bzw. *proA*-Deletionsmutanten die Bildung von größeren und schneller wachsenden Kolonien auf (Abb. 18 B, markiert mit einem weißen Pfeil). Einige der

größeren Kolonien wurden von den Salzplatten isoliert. Wurden diese Stämme (DRB16, DRB28, DRB40) nun auf Minimalagarplatten mit 0,8 M NaCl replattiert, so waren sie in der Lage wie der Wildtyp zu wachsen (Abb. 18 C).

Folglich besitzen diese größeren und schneller wachsenden Kolonien trotz der Deletion von *proBA* bzw. *proA* einen Prolin-prototrophen Phänotyp. Eine Erklärung für diesen Sachverhalt ist die Bildung einer sogenannten Suppressormutation, welche es den betroffenen Stämmen ermöglicht den durch die γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase ProA katalysierten Schritt im Prolinbiosyntheseweg durch Enzyme anderer Stoffwechselwege zu ersetzen.

Für die Quantifizierung der Rate für das Auftreten dieser Suppressormutanten wurden die Stämme GWB120, GWB128 und DRB4 in SMM-Medium mit 0,8 M NaCl und 10 mM Prolin angezogen. Das externe Prolin sollte hierbei die Bildung von Suppressormutanten während der Kultivierung unterbinden. Nach anschließender Entfernung des Prolins in mehreren Waschschritten wurden verschiedene Verdünnungen auf SMM-Agarplatten mit 0,8 M NaCl in An- und Abwesenheit von Prolin plattiert und nach mehrtägiger Inkubation ausgezählt. Die Pro^+ -Suppressormutationen traten mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-6} auf (Tab. 16). Die Häufigkeit mit der Mutationen in Bakteriengenomen auftreten liegt typischerweise bei 10^{-7} bis 10^{-8} (Kunkel, 2004). Das Auftreten der Pro^+ -Suppressormutationen mit einer 10-fach höheren Häufigkeit deutete darauf hin, dass es, bedingt durch den experimentellen Ansatz zu einer Überschätzung der tatsächlichen Mutationsrate kam, weil die Suppressorkolonien auf den Agarplatten zum Teil nur schwer vom Hintergrund zu unterscheiden waren.

Tab. 16: Rate für das Auftreten von Pro^+ -Suppressormutationen

Stamm	10 mM Prolin (KBE/ml)	0 mM Prolin (KBE/ml)	Mutationsrate
GWB120	$3,3 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^{-6}$
GWB128	$3,7 \cdot 10^8$	$0,7 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^{-6}$
DRB4	$1,2 \cdot 10^8$	$0,6 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^{-6}$

Insgesamt wurden 27 unabhängige Pro⁺-Suppressorstämme in dieser Arbeit isoliert. 12 dieser Stämme waren Derivate von GWB120 und besaßen demzufolge neben einer *proBA*-Deletion eine Mutation im *rocDEF*-Promotor. Bei weiteren 11 Stämmen handelte es sich um Derivate von GWB128, welche ebenfalls eine *proBA*-Deletion und zusätzlich eine Mutation im Gen *rocR* besaßen. 4 Stämme waren Derivate von DRB4 und wiesen eine *proA*-Deletion auf. Allen 27 Suppressormutanten (DRB16 - DRB31, DRB33 - DRB43) wurden nach ihrer Isolierung Nummern zugewiesen (Pro⁺-20 bis Pro⁺-46) (Tab. 3).

5.2.2 Lokalisierung der Pro⁺-Suppressormutationen im Chromosom von *B. subtilis*

Um zu klären, welche Mutation es den isolierten Pro⁺-Suppressorstämmen ermöglicht die *proA*-Deletion im Prolinbiosyntheseweg zu umgehen und folglich unter Hochsalzbedingungen wachsen zu können, wurde für drei Derivate des Stammes GWB120 (DRB16, DRB17, DRB20) und jeweils ein Derivat der Stämme GWB128 (DRB28) und DRB4 (DRB40) in Zusammenarbeit mit Dr. Fabian Commichau (Göttingen) eine Genom-Resequenzierung durchgeführt. Diese offenbarte zwei unterschiedliche Klassen von Pro⁺-Suppressormutationen basierend auf deren Lokalisation. Vier der fünf untersuchten Stämme zeigten eine Mutation in der Bindestelle des Transkriptionsfaktors AhrC, welche in der Promotorregion des *argC*-Operons lokalisiert ist (Klasse I) (Abb. 19). Bei einem Stamm befand sich die Mutation direkt im *ahrC*-Gen, welches für den Transkriptionsfaktor AhrC codiert (Klasse II) (Abb. 20).

AhrC fungiert als Transkriptions-Repressor des *argC*-Operons (Abb. 16 B) und das *argC*-Operon codiert für Gene der Arginin-Biosynthese (Abb. 16 A und B) (Garnett *et al.*, 2008; Czaplewski *et al.*, 1992). Mutationen im AhrC-Regulatorprotein oder der Bindestelle von AhrC in der Promotorregion von *argC* führen vermutlich zu einer erhöhten Expression des *argC*-Operons und folglich zu größeren Ornithin-Pools (Abb. 16 A). *B. subtilis* ist in der Lage dazu ausgehend von Ornithin mittels der Ornithin-Aminotransferase (RocD) γ -Glutamylsemialdehyd zu bilden. Hierbei handelt es sich um das gleiche Produkt, welches auch ProA als Intermediat in der Prolinbiosynthese generiert (Abb. 16 A). Dies würde eine Umgehung der von

ProB und ProA katalysierten Schritte in der Prolinbiosynthese ermöglichen (Gardan *et al.*, 1995; Fischer, 1993; Baumberg und Harwood, 1979) (Abb. 16 A). Auch für die restlichen 22 isolierten Suppressormutanten konnte mittels Sequenzierung der *argC*-Promotorregion und des *ahrC*-Gens eine Mutation in einer dieser beiden Regionen gezeigt werden.

Zusammenfassend wurde für 20 der Stämme die Mutation im *argC*-Promotor und für 7 der Stämme die Mutation im *ahrC*-Gen lokalisiert (Tab. 17). Beide Klassen von Mutationen traten sowohl in den von GWB120 und GWB128 als auch in den von DRB4 abgeleiteten Suppressormutanten auf. Der genetische Hintergrund hatte demzufolge keinen Einfluss auf die Lage bzw. die Art der Suppressormutation. In allen drei Fällen wurde in den genutzten Ausgangsstämmen das *proA*-Gen deletiert. Folglich ist sichergestellt, dass der Verlust von ProA der Auslöser für das Auftauchen der Suppressormutationen ist und nicht etwa die Kombination aus dem Fehlen von ProB und ProA.

Tab. 17: Die zwei Klassen von Pro⁺-Suppressormutationen

	Klasse I	Klasse II
Ort der Punktmutation	innerhalb der regulatorischen Region von <i>argC-argJ-argB-argD-carAB-argF</i>	innerhalb des <i>ahrC</i> -Gens
Beschreibung	<i>argC</i> -P1 (1 Isolat) <i>argC</i> -P2 (3 Isolate) <i>argC</i> -P3 (5 Isolate) <i>argC</i> -P4 (4 Isolate) <i>argC</i> -P5 (2 Isolate) <i>argC</i> -P6 (2 Isolate) <i>argC</i> -P7 (1 Isolat) <i>argC</i> -P8 (2 Isolate)	L25Stop (1 Isolat) Q38A (1 Isolat) T40K (1 Isolat) G101D (1 Isolat) A103D (1 Isolat) G120Stop (1 Isolat) N143Stop (1 Isolat)

5.2.3 Klasse I: Punktmutation in der regulatorischen Region des *argC*-Operons

Die transkriptionelle Kontrolle der Argininbiosynthese wird durch die reprimierende Funktion des DNA-bindenden Proteins AhrC gewährleistet. In Anwesenheit des Corepressors L-Arginin interagiert AhrC mit Operatorregionen innerhalb der Promotorbereiche des *argCJBD-carAB-argF*- und des *argGH*-Operons, welche allesamt für Gene der Arginin-Biosynthese codieren (Smith *et al.*, 1986; Miller *et al.*, 1997). Diese Operatorregionen enthalten DNA-Sequenzen, die den 18 bp großen pseudo-palindromischen ARG-Boxen des Arginin-Repressors ArgR aus *E. coli* ähneln (Smith *et al.*, 1989). Das *argC*-Operon besitzt zwei AhrC-Bindestellen, welche mit *argCo*₁ und *argCo*₂ bezeichnet werden. Die Bindestelle *argCo*₁ ist hoch affin gegenüber AhrC und überlappt mit dem Promotor. Die geringer affine Bindestelle *argCo*₂ ist im 5'-Bereich der codierenden Sequenz des *argC*-Gens lokalisiert (Czaplewski *et al.*, 1992). Die Pro⁺-Suppressorstämme der Klasse I besitzen allesamt Mutationen in der hoch affinen Bindestelle *argCo*₁ in der regulatorischen Region vor dem *argC*-Gen (Abb. 19).

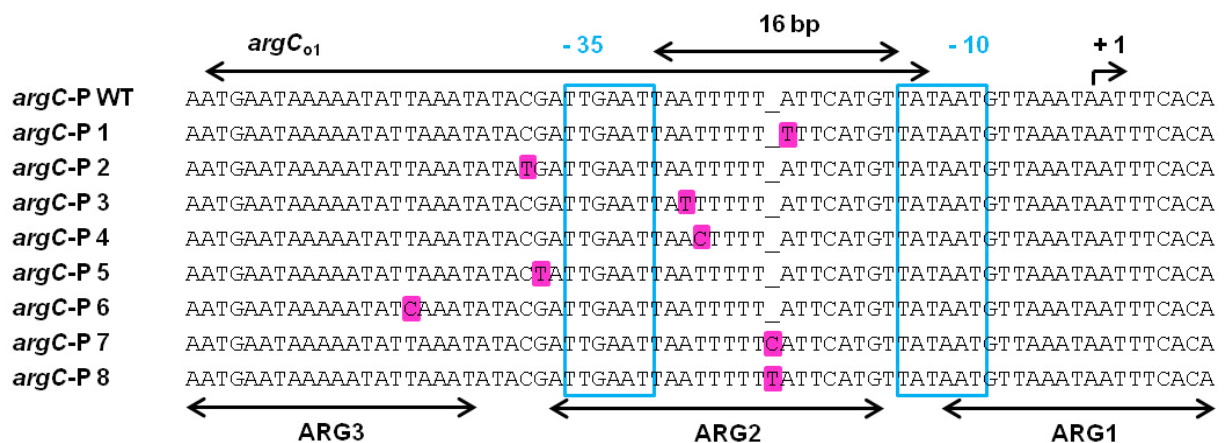


Abb. 19: Lokalisierung der Punktmutationen in der *argC*-Promotorregion

In dieser Arbeit konnten acht verschiedene Typen von Mutationen im Promotorbereich des *argC*-Operons gefunden werden. Alle diese Mutationen befinden sich in der Bindestelle (*argCo*₁) des negativen Regulatorproteins AhrC und sind pink unterlegt. Die -35er- und -10er-Region sowie deren 16-Basenpaar-Spacer sind eingezeichnet. DNA-Sequenzen, die den pseudo-palindromischen ARG-Boxen des Arginin-Repressors ArgR aus *E. coli* ähneln, sind mit ARG1, ARG2 und ARG3 gekennzeichnet.

Die meisten dieser Mutationen führen zu einem Basenaustausch, während zwei der Mutationen den Spacer betreffen. Hierbei wird der ursprüngliche 16 Basenpaare lange Spacer um eine Base erweitert (Abb. 19).

5.2.4 Klasse II: Punktmutation im Transkriptionsregulator AhrC

Die Pro⁺-Suppressorstämme der Klasse II besitzen Punktmutationen innerhalb des *ahrC*-Gens, welche zu einer Aminosäure-Substitution in AhrC oder zur Ausbildung eines Stop-Codons und damit zum Abbruch der Proteinbiosynthese führen (Abb. 20). Um sie vom Wildtyp-AhrC zu unterscheiden, werden diese modifizierten Proteine im Folgenden als AhrC* bezeichnet.

AhrC ist ein bifunktionelles Protein (Mountain und Baumberg, 1980; North *et al.*, 1989). Es reprimiert in Anwesenheit von Arginin einerseits die Transkription der Arginin-Biosynthese-Cluster *argCJBD-carAB-argF* und *argGH* (Miller *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1989). Andererseits ist es an der Aktivierung der Gencluster *rocABC* und *rocDEF* (Abb. 16 A, 16 C) beteiligt, welche für Gene des Arginin-Katabolismus codieren (Gardan *et al.*, 1995). Der AhrC-Regulator aus *B. subtilis* ist ein Hexamer bestehend aus Untereinheiten, welche 149 Aminosäuren groß sind (Dennis *et al.*, 2002) (Abb. 20). Diese können in zwei Domänen unterschieden werden. Die N-terminalen Domänen (Aminosäuren 1 bis 64) enthalten ein Helix-Turn-Helix-Motiv und fungieren als DNA-Bindedomänen (Garnett *et al.*, 2008; Garnett *et al.*, 2007 a) (Abb. 20). Die C-terminalen Domänen (Aminosäuren 65 bis 149) formen den Kern des Proteins und bilden die Interaktionen zwischen den einzelnen Untereinheiten aus (Abb. 20). Auch der Corepressor Arginin bindet an die C-terminale Domäne. (Garnett *et al.*, 2008; Garnett *et al.*, 2007 b). Betrachtet man die Positionen der Aminosäuresubstitutionen in AhrC*, so treten diese sowohl in der N-terminalen als auch in der C-terminalen Domäne auf. Die meisten Mutationen befinden sich hierbei im mittleren Bereich der beiden Domänen (Abb. 20). Die Ausbildung eines Stopcodons tritt ebenfalls in beiden Domänen auf. Hierbei wird die Proteinbiosynthese in einem Fall sehr frühzeitig schon nach

24 Aminosäuren abgebrochen. In zwei weiteren Fällen erfolgt der Abbruch erst nach 119 und 142 Aminosäuren (Abb. 20).

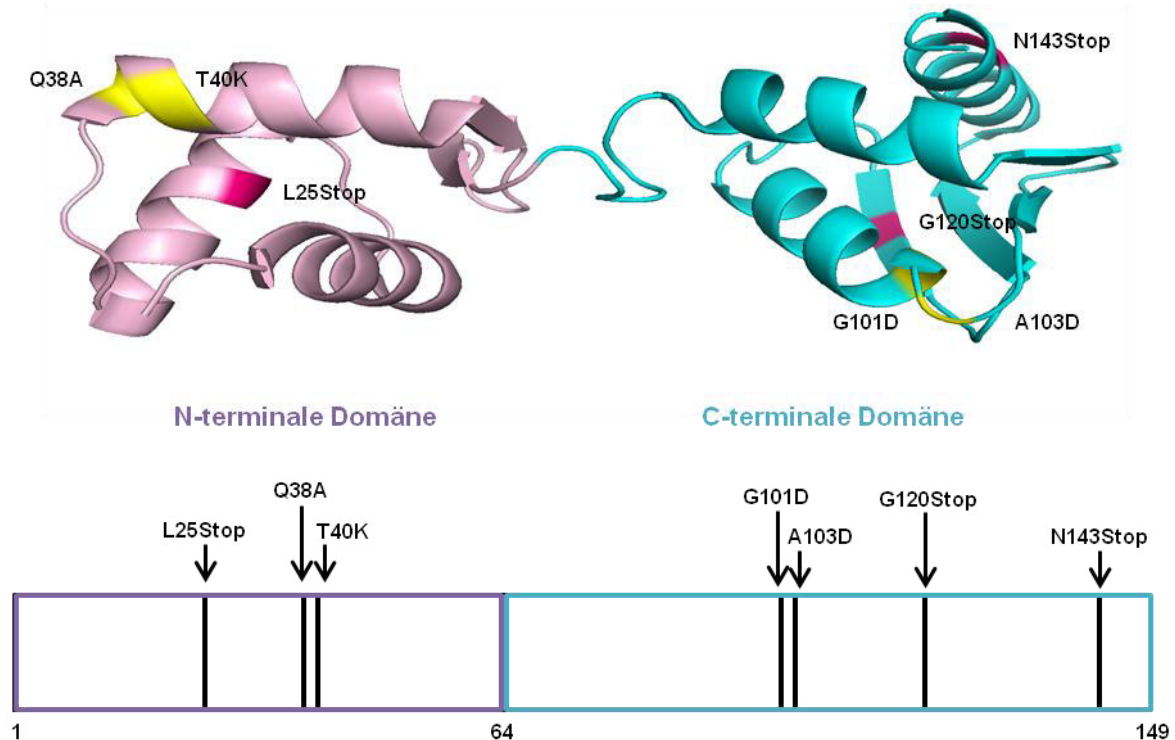


Abb. 20: Lokalisierung der Punktmutationen im Transkriptionsregulator AhrC

Die 149 Aminosäuren langen Untereinheiten des AhrC-Regulators aus *B. subtilis* (PDB Code 1F9N) (Dennis *et al.*, 2002) bestehen aus zwei funktionellen Domänen: Der N-terminalen Domäne (1-64, lila) und der C-terminalen Domäne (65-149, blau). Mutationen, die einen Aminosäure-Austausch bewirken sind in der Kristallstruktur gelb markiert. Mutationen die zu einem Stop der Proteinbiosynthese führen sind pink dargestellt. Die Positionen der Punktmutationen in AhrC sind mit Pfeilen markiert und der Aminosäureaustausch ist eingezeichnet.

5.2.5 Untersuchung des Einflusses der Punktmutationen im *argC*-Promotor (Klasse I) auf die Transkription des *argC*-Operons

Mithilfe von *treA*-Fusionen sollte die Auswirkung der zwei verschiedenen Klassen von Mutationen, welche in den Pro⁺-Suppressorgenomen identifiziert werden konnten, auf die Transkription des *argC*-Operons untersucht werden. Zunächst wurde hierbei der Einfluss der in der regulatorischen Region des *argC*-Operons gefundenen Mutationen der Klasse I (Abb. 19) auf die Transkription des *argC*-Operons überprüft. Hierfür wurden *treA*-Reporterfusionen für die mutierten *argC*-Promotoren hergestellt und anschließend mittels Integration in das chromosomale *amyE*-Gen von

B. subtilis sowohl im Wildtyp-Hintergrund als auch in einer *ahrC*-Deletionsmutante vermessen.

In den daraus resultierenden *argC*-Mutanten DRB76, DRB77, DRB78, DRB79, DRB80, DRB81 sowie den *argC/ahrC*-Mutanten DRB62, DRB63, DRB65, DRB66, DRB67 und DRB64 wurde die Phosphoglukosidase-Aktivität in SMM in An- und Abwesenheit des Corepressors Arginin untersucht. Als Kontrollen wurden das Wildtypderivat DRB82 und die *ahrC*-Deletionsmutante DRB68 mitgeführt, welche jeweils den Wildtyp-*argC*-Promotor enthielten (Abb. 21).

Für die Messungen der *argC*-Transkription in den *ahrC*-Deletionsmutanten konnte wie erwartet aufgrund des Fehlens des Repressors AhrC eine vollständig deregulierte Transkription des *argC*-Operons beobachtet werden (Abb. 21 C). Dies galt sowohl für den Stamm DRB68 mit dem Wildtyp-*argC*-Promotor als auch für die Stämme DRB62, DRB63, DRB65, DRB66, DRB67 und DRB64 mit den mutierten *argC*-Promotoren (Abb. 21 C). Da der Corepressor Arginin an die C-terminale Domäne von AhrC bindet (Garnett *et al.*, 2008), aber in den *ahrC*-Deletionsmutanten kein AhrC synthetisiert werden kann, übte die Anwesenheit von Arginin natürlich auch keinen zusätzlichen Einfluss auf die Transkription des *argC*-Operons aus (Abb. 21 D).

Die vollständig deregulierte Transkription des *argC*-Operons in den *ahrC*-Deletionsmutanten (Abb. 21 C, D) galt es nun mit den Messungen der *argC*-Promotormutanten im Wildtyp-Hintergrund zu vergleichen (Abb. 21 A, B). Ohne die Zugabe des Corepressors Arginin war die Transkription des *argC*-Operons bei den Promotormutanten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle deutlich dereguliert (Abb. 21 A). Einige der Mutationen im *argC*-Promotor führten zu einer fast vollständigen Deregulation (DRB78, DRB80, DRB81) der Transkription, während andere *argC*-Promotor-Mutationen die Transkription zwar deutlich erhöhten jedoch nicht komplett deregulierten (DRB76, DRB77, DRB79) (Abb. 21 A). In Anwesenheit des Corepressors Arginin (Abb. 21 B) ist das Transkriptionslevel des *argC*-Operons deutlich geringer als in Abwesenheit von Arginin (Abb. 21 A). In Anwesenheit von Arginin führt keine der Mutationen im *argC*-Promotor zu einer kompletten Deregulation der Transkription (Abb. 21 B).

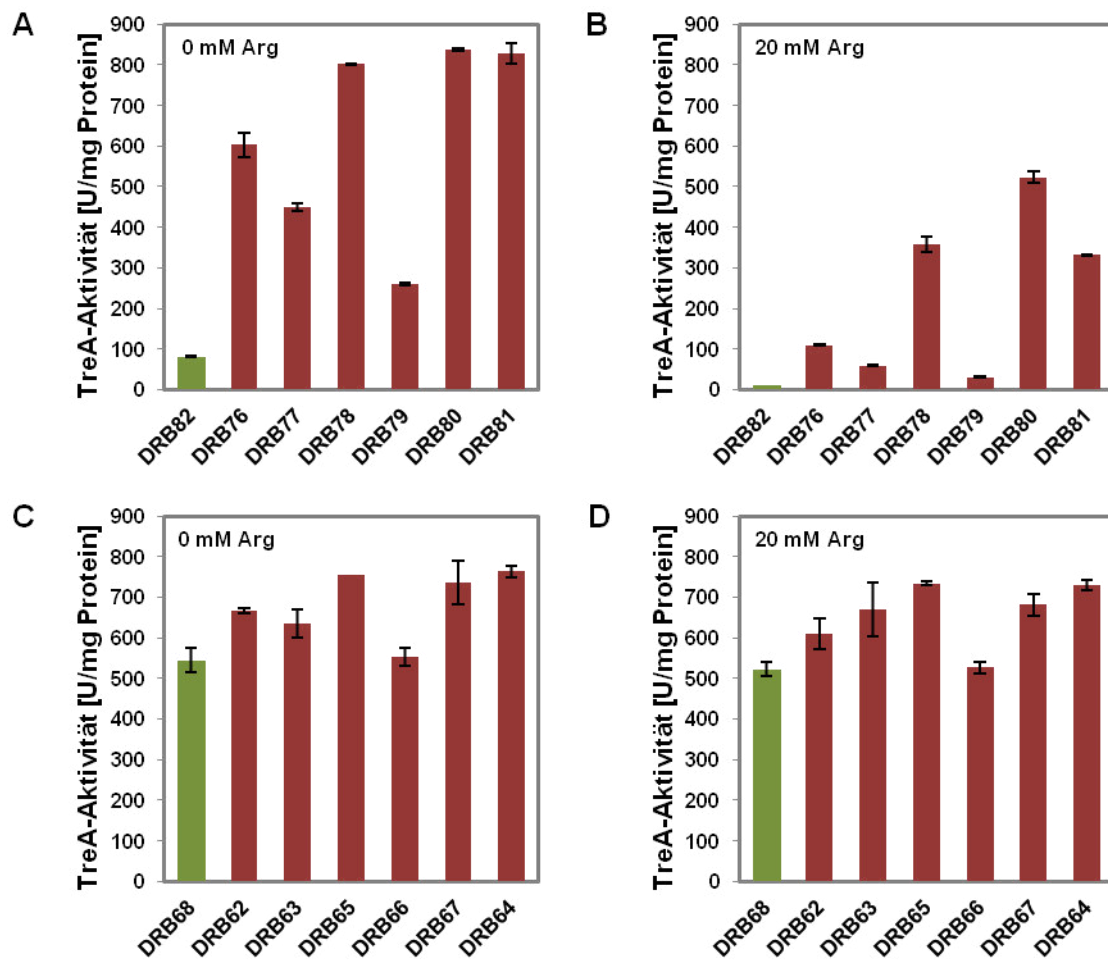


Abb. 21: Einfluss der Punktmutationen in der *argC*_{ot}-Bindestelle innerhalb der regulatorischen Region des *argC*-Operons auf dessen Transkription

(A, B) Die *argC-treA*-Reporterstämme im Wildtyp-Hintergrund DRB82 (*argC*-PWT), DRB76 (*argC*-P1), DRB77 (*argC*-P3), DRB78 (*argC*-P4), DRB79 (*argC*-P5), DRB80 (*argC*-P6) und DRB81 (*argC*-P8) wurden bis zu einer OD₅₇₈ von 1,8 - 2 in SMM in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von 20 mM Arginin (Arg) angezogen. (C, D) Die *argC-treA*-Reporterstämme im Δ ahrC-Hintergrund DRB68 (Δ ahrC, *argC*-PWT), DRB62 (Δ ahrC, *argC*-P1), DRB63 (Δ ahrC, *argC*-P3), DRB65 (Δ ahrC, *argC*-P4), DRB66 (Δ ahrC, *argC*-P5), DRB67 (Δ ahrC, *argC*-P6) und DRB64 (Δ ahrC, *argC*-P8) wurden bis zu einer OD₅₇₈ von 1,8 - 2 in SMM in Ab- (C) und Anwesenheit (D) von 20 mM Arginin (Arg) angezogen. (A-D) Anschließend wurden die Zellen für die TreA-Enzymmessungen geerntet (4.4.4). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen berechnet. Der Kontrollstamm mit dem Wildtyp-*argC*-Promotor ist grün und die *argC*-Promotormutanten sind rot dargestellt.

Neben AhrC wird die Transkription des *argC*-Operons durch das Repressor-Protein CodY reguliert (Abb. 16 B). Dieser globale Transkriptionsregulator kontrolliert die Expression von mehr als 100 Genen und Operons in *B. subtilis* (Brinsmade *et al.*, 2014; Belitsky und Sonenshein, 2013). Folglich wurden die oben beschriebenen *treA*-Reporterfusionen mit den mutierten *argC*-Promotoren nicht nur im Wildtyp-Hintergrund und in Δ ahrC-Mutanten, sondern auch in Δ codY- und

$\Delta codY/ahrC$ -Mutanten untersucht. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte hierbei keine Beeinflussung der *argC*-Transkription durch den Transkriptionsregulator CodY festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Punktmutationen in der regulatorischen Region vor dem *argC*-Gen die Bindung des Transkriptionsrepressors AhrC an die Bindestelle *argCo*₁ verschlechtern. Dies führt zu einer gesteigerten bzw. vollständig deregulierten Transkription des *argC*-Operons und vermutlich zu einer Erhöhung der intrazellulären Ornithin-pools in den Suppressormutanten (Abb. 16 A). Ornithin kann wiederum mittels der Ornithin-Aminotransferase (RocD) in γ -Glutamyl-Semialdehyd umgewandelt werden. Hierbei handelt es sich um das gleiche Produkt, das auch ProA als Intermediat in der Prolinbiosynthese generiert (Abb. 16 A). Folglich ist den Pro⁺-Suppressormutanten eine Umgehung der von ProB und ProA katalysierten Schritte in der Prolinbiosynthese möglich. Das γ -Glutamyl-Semialdehyd kann anschließend von den Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktasen ProH und ProG für die Synthese von Prolin verwendet werden (Abb. 16 A). Schlussendlich sind Pro⁺-Suppressormutanten der Klasse I dazu in der Lage osmoprotektive interne Prolinmengen zu akkumulieren und erlangen die Fähigkeit unter Hochsalzbedingungen zu wachsen.

5.2.6 Untersuchung des Einflusses der Punktmutationen im Regulatorprotein AhrC (Klasse II) auf die Transkription des *argC*-Operons

Die Pro⁺-Suppressorstämme der Klasse II besitzen Punktmutationen im *ahrC*-Gen, welche zu Aminosäuresubstitutionen in AhrC oder zur Ausbildung eines Stopcodons und folglich zum Abbruch der Proteinbiosynthese von AhrC führen (Abb. 20).

Um den Einfluss der Mutationen im Regulatorprotein auf die Transkription des *argC*-Operons zu untersuchen, wurde eine *treA*-Reporterfusion für den Wildtyp-*argC*-Promotor konstruiert und anschließend in das chromosomale *amyE*-Gen des *B. subtilis*-Wildtypstammes JH642, einer *ahrC*-Deletionsmutante sowie aller sieben *ahrC*^{*}-Stämme integriert. In den daraus resultierenden Stämmen DRB82 (*ahrC*-WT), DRB68 ($\Delta ahrC$), DRB69 (AhrC^{*}:L25Stop), DRB70 (AhrC^{*}:T40K), DRB71 (AhrC^{*}:Q38A), DRB72 (AhrC^{*}:G101D), DRB73 (AhrC^{*}:G120Stop), DRB74 (AhrC^{*}:N143Stop) und DRB75 (AhrC^{*}:A103D) wurde die Phosphoglukosidase-

Aktivität in SMM in An- und Abwesenheit des Corepressors Arginin untersucht (Abb 22).

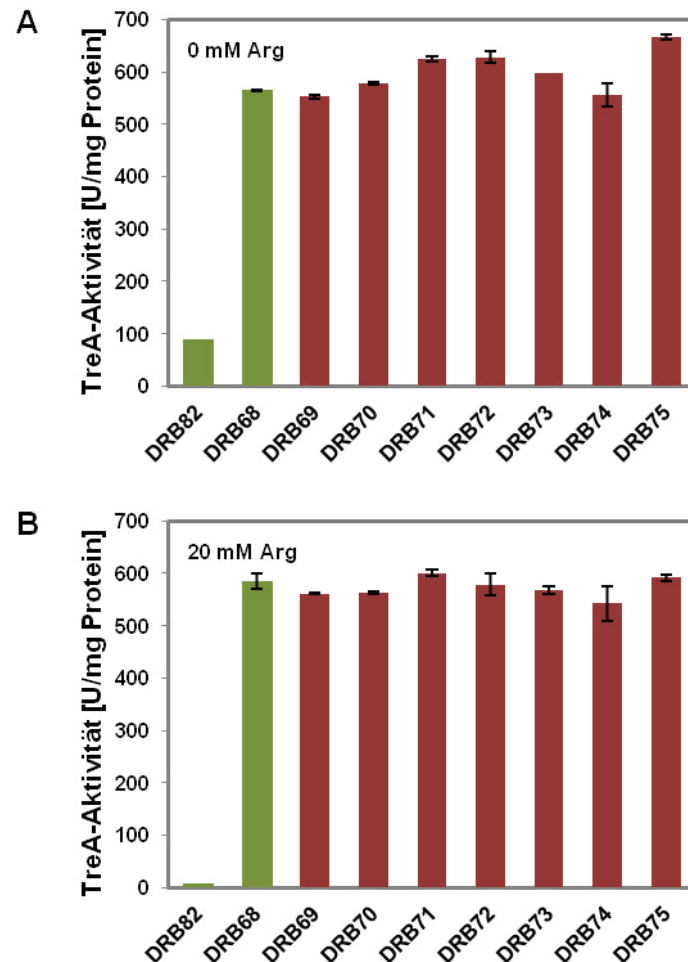


Abb. 22: Einfluss der Punktmutationen im negativen Regulator AhrC auf die Transkription des *argC*-Operons

(A-D) Die *argC-treA*-Reporterstämme DRB82 (AhrC-WT), DRB68 ($\Delta ahrC$), DRB69 (AhrC*:L25Stop), DRB70 (AhrC*:T40K), DRB71 (AhrC*:Q38A), DRB72 (AhrC*:G101D), DRB73 (AhrC*:G120Stop), DRB74 (AhrC*:N143Stop) und DRB75 (AhrC*:A103D) wurden bis zu einer OD₅₇₈ von 1,8 - 2 in SMM in An- (B) und Abwesenheit (A) von 20 mM Arginin (Arg) angezogen. Anschließend wurden die Zellen für die TreA-Enzymmessungen geerntet (4.4.4). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen berechnet.

Ohne Zugabe des Corepressors war die ist die Transkription des *argC*-Operons bei den Regulatormutanten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle DRB82 und zur *ahrC*-Deletionsmutante DRB68 vollständig dereguliert (Abb. 22 A). Der negative Regulator AhrC kann aller Wahrscheinlichkeit nach aufgrund seiner Mutation nicht an

den Operator in der *argC*-Promotorregion binden. Durch den Wegfall des Repressors wird das *argC*-Operon verstärkt transkribiert.

In Anwesenheit von Arginin zeigte die Wildtyp-Kontrolle DRB82 wie erwartet eine geringere Transkription als ohne Corepressor (Abb. 22 B). Die Transkription von *argC* in der *ahrC*-Deletionsmutante DRB68 und in den *ahrC*-Mutanten blieb in Anwesenheit des Corepressors auf dem gleichen Level wie ohne Corepressor (Abb. 22 B). Dies macht auch Sinn, wenn man bedenkt, dass die Anwesenheit des Corepressors keinen Einfluss mehr hat, wenn der Regulator nicht an die Promotorregion binden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Punktmutationen im Transkriptionsregulator AhrC dessen Bindung an die Erkennungssequenz *argCo*₁ im Promotorbereich des *argC*-Operons verschlechtern. Hier wie auch schon im Fall der Klasse I-Pro⁺-Suppressormutanten kommt es zu einer gesteigerten bzw. vollständig deregulierten Transkription des *argC*-Operons und damit vermutlich zu einer Erhöhung der intrazellulären Ornithinpools und einer damit verbundenen Umwandlung in γ -Glutamyl-Semialdehyd mit Hilfe der Ornithin-Aminotransferase RocD (Abb. 16 A). Das γ -Glutamyl-Semialdehyd kann von den Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktasen ProH und ProG für die Prolinsynthese verwendet werden (Abb. 16 A). Folglich sind auch Pro⁺-Suppressormutanten der Klasse II dazu in der Lage Osmostress-protective interne Prolinmengen zu akkumulieren und besitzen die Fähigkeit unter Hochsalzbedingungen zu wachsen.

5.2.7 Physiologische Charakterisierung der Pro⁺-Suppressormutanten hinsichtlich ihres Wachstums

Das Protein ProA verlinkt den anabolen und den osmoadaptiven Prolinbiosyntheseweg in *B. subtilis* (Brill *et al.*, 2011 a; Brill *et al.*, 2011 b; Bremer, 2002). ProA übernimmt demzufolge eine zentrale Rolle in der Synthese von Prolin für die Proteinbiosynthese und in der Bereitstellung sehr großer Prolinmengen für den Einsatz als osmotische Schutzsubstanz (Brill *et al.*, 2011 a; Brill *et al.*, 2011 b).

Es zeigte sich, dass Pro^+ -Suppressormutationen im regulatorischen Bereich von *argC* und im Transkriptionsregulator AhrC das Wachstum von *proBA*- bzw. *proA*-Deletionsmutanten in Minimalmedium mit 0,8 M NaCl ermöglichen (5.2.1). Es stellte sich nun die Frage, ob die Suppressormutanten ebenfalls dazu in der Lage sind noch höhere Osmolaritäten zu kompensieren. Hierzu wurde das Wachstum des *B. subtilis*-Wildtypstammes JH642, der ΔproHJ -Mutante JSB8 und der Ausgangsstämme GWB120, GWB128 und DRB4 mit dem Wachstum repräsentativer Suppressormutanten in SMM-Medium mit 1,2 M NaCl verglichen (Abb.23).

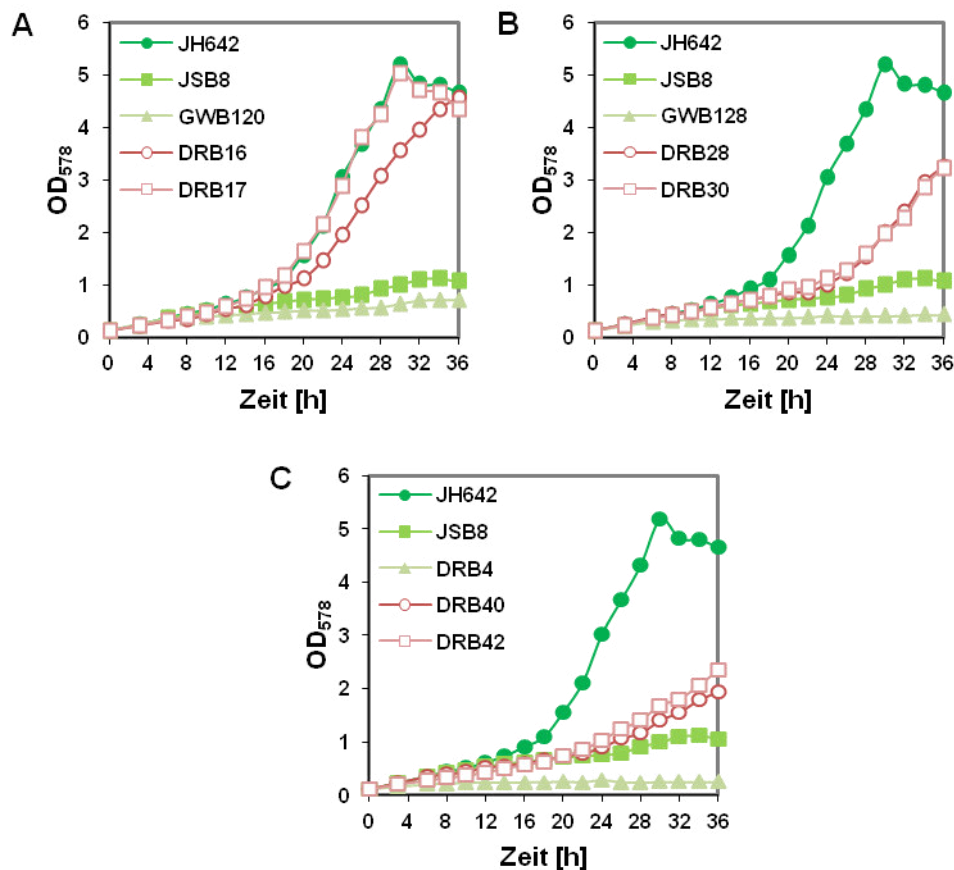


Abb. 23: Wachstum der *B. subtilis*- Pro^+ -Suppressormutanten unter Hochsalzbedingungen

(A-C) Der *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 und seine Derivate JSB8 (ΔproHJ); (A) GWB120 (ΔproBA , rocDEF^*), DRB16 (ΔproBA , rocDEF^* , argC^*), DRB17 (ΔproBA , rocDEF^* , ahrC^*); (B) GWB128 (ΔproBA , rocR^*), DRB28 (ΔproBA , rocR^* , argC^*), DRB30 (ΔproBA , rocR^* , ahrC^*); (C) DRB4 (ΔproA), DRB40 (ΔproA , argC^*) und DRB42 (ΔproA , ahrC^*) wurden in SMM + 1,2 M NaCl kultiviert. Die OD_{578} wurde alle zwei Stunden photometrisch bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Wachstumsexperiment, dessen Daten in einem unabhängigen Experiment bestätigt wurden. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen berechnet. Kontroll- und Ausgangsstämme sind in grün und Pro^+ -Suppressormutanten in rot dargestellt.

Hierbei wurden für jeden der drei Ausgangsstämme jeweils zwei repräsentative Suppressormutanten ausgewählt: Eine, die zusätzlich eine Mutation in der *argC*-Promotorregion zeigte (Klasse I), und eine, die eine Mutation im Transkriptionsregulator AhrC aufwies (Klasse II). Erwartungsgemäß war der *B. subtilis*-Wildtypstamm dazu in der Lage sich an hochosmolare Bedingungen anzupassen, während die Deletion des *proHJ*-Operons zu einem osmotisch sensitiven Phänotyp führte (Abb. 23) (Brill *et al.*, 2011 b). Die getesteten Pro⁺-Suppressorstämme zeigten alle die Fähigkeit unter hochosmolaren Bedingungen bei 1,2 M NaCl zu wachsen (Abb. 23). Die Mutanten waren folglich dazu in der Lage genügend γ -Glutamyl-Semialdehyd für die osmoadaptive Prolinbiosynthese bereit zu stellen. Auffällig war, dass die vom Ausgangsstamm GWB120 ($\Delta proBA$, *rocDEF*^{*}) abgeleiteten Suppressormutanten wie der Wildtypstamm wuchsen (Abb. 23 A), während die von GWB128 ($\Delta proBA$, *rocR*^{*}) (Abb. 23 B) und DRB4 ($\Delta proA$) (Abb. 23 C) abgeleiteten Stämme zwar ein deutlich besseres Wachstum als die $\Delta proHJ$ -Mutante zeigten, jedoch nicht das Wildtyplevel erreichten.

5.2.8 Physiologische Charakterisierung der Pro⁺-Suppressormutanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Prolinakkumulation

Da die Pro⁺-Suppressormutationen das Wachstum unter Hochsalzbedingungen (SMM + 1,2 M NaCl) erlauben, stellt sich die Frage, ob die untersuchten Suppressorstämme auch dazu in der Lage sind osmoprotektive intrazelluläre Prolinlevel zu synthetisieren. Dazu wurde der interne Prolingehalt des *B. subtilis*-Wildtypstammes JH642, der $\Delta proHJ$ -Mutante JSB8 und der Ausgangsstämme GWB120, GWB128 und DRB4 mit dem Prolingehalt repräsentativer Suppressormutanten (5.2.7) verglichen (Abb. 24).

Erwartungsgemäß war die $\Delta proHJ$ -Mutante JSB8 mit einem internen Pool von rund 50 mM nicht dazu in der Lage Prolin in hohen Konzentrationen als osmotische Schutzsubstanz zu synthetisieren (Abb. 24 D - F). Auch die Ausgangsstämme GWB120 (Abb. 24 D), GWB128 (Abb. 24 E) und DRB4 (Abb. 24 F) zeigten sehr geringe interne Prolin pools von unter 100 mM.

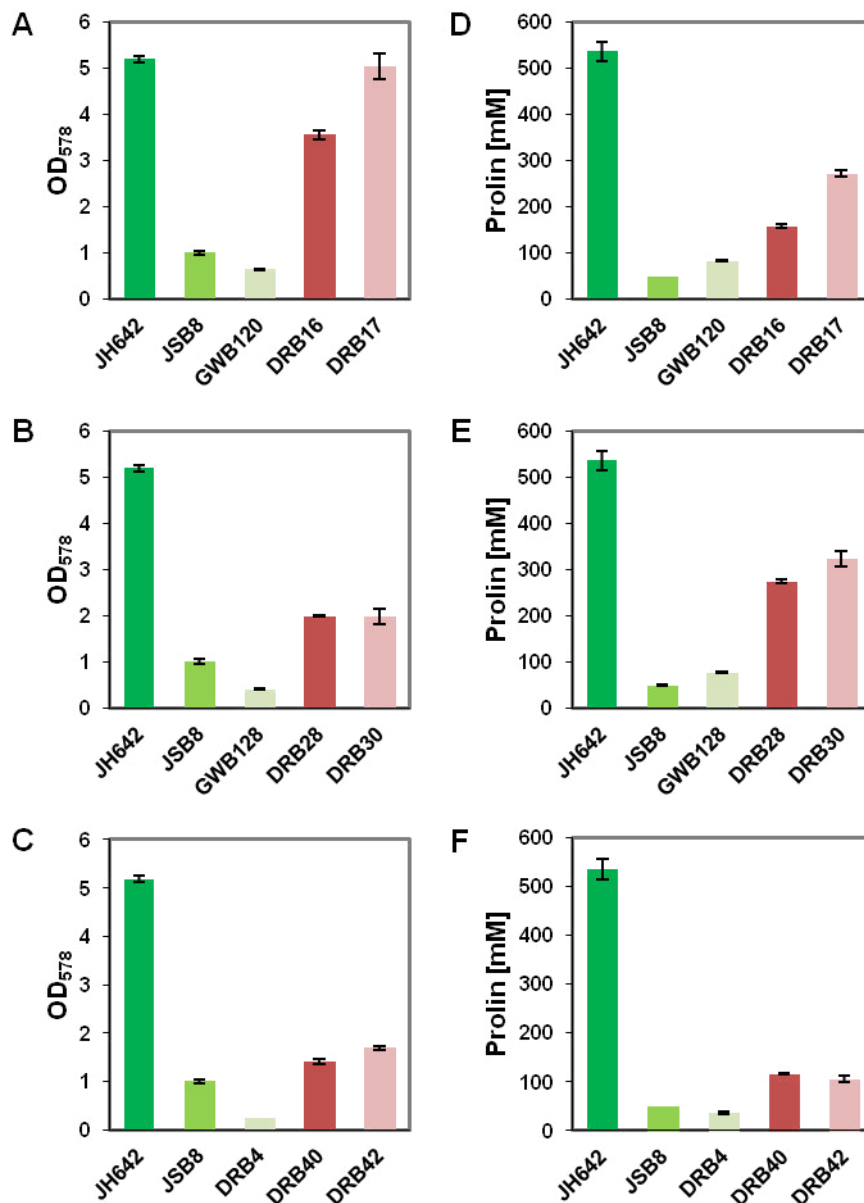


Abb. 24: Korrelation zwischen Wachstum osmotisch gestresster Pro⁺-Suppressormutanten und der Menge an intrazellulär akkumuliertem Prolin

(A-C) Der *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 und seine Derivate JSB8 ($\Delta proHJ$); (A) GWB120 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$), DRB16 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$, $argC^*$), DRB17 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$, $ahrC^*$); (B) GWB128 ($\Delta proBA$, $rocR^*$), DRB28 ($\Delta proBA$, $rocR^*$, $argC^*$), DRB30 ($\Delta proBA$, $rocR^*$, $ahrC^*$); (C) DRB4 ($\Delta proA$), DRB40 ($\Delta proA$, $argC^*$) und DRB42 ($\Delta proA$, $ahrC^*$) wurden in SMM + 1,2 M NaCl kultiviert. Der Wachstumsertrag wurde nach 30 h photometrisch (OD₅₇₈) bestimmt. (D-F) Die Stämme wurden bis zu einer OD₅₇₈ von 1,8 - 2 in SMM + 1,2 M NaCl angezogen. Die Bestimmung des Prolingehaltes erfolgte nach der von Bates *et al.* (1973) beschriebenen Methode (4.4.2). (A-F) Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen berechnet. Kontroll- und Ausgangsstämme sind in grün und Pro⁺-Suppressormutanten in rot dargestellt.

Dies stand in Korrelation mit dem osmosensitiven Wachstumsphänotyp dieser Stämme (Abb. 24 A - C). Vergleichend dazu war der Wildtypstamm JH642 in der Lage mehr als 500 mM Prolin zu akkumulieren (Abb. 24 D - F). Die

Pro⁺-Suppressormutanten waren ebenfalls befähigt mehr Prolin in der Zelle anzuhäufen als ihre Vaterstämme und als die $\Delta proHJ$ -Mutante JSB8. Auffällig hierbei war jedoch, dass keine der Suppressormutanten einen gleich großen Prolinpool wie der Wildtyp anhäufte. Die von GWB120 abgeleiteten Mutanten akkumulierten 200 bis 300 mM Prolin (Abb. 24 D) und die von GWB128 abgeleiteten Stämme häuften 300 bis 400 mM Prolin (Abb. 24 E) im Zellinneren an. Die von DRB4 abgeleiteten Stämme zeigten einen internen Prolinpool von 100 bis 150 mM (Abb. 24 F). Diese Werte machen deutlich, dass bereits geringere Prolinlevel als sie der Wildtypstamm JH642 aufweist ausreichend sind, um eine osmoprotektive Wirkung zu erzielen und ein Wachstum unter Hochsalzbedingungen zu ermöglichen.

5.2.9 Korrelation zwischen externem Salzgehalt und interner Prolinakkumulation

Durch die Akkumulation von intrazellulär synthetisiertem Prolin passt sich *B. subtilis* an hohe externe Salzkonzentrationen an. Misst man den intrazellulären Prolinpool des Wildtypstammes JH642 bei verschiedenen Osmolaritäten von 0 M bis 1,2 M NaCl, so zeigt sich eine lineare Abhängigkeit des intrazellulär akkumulierten Prolins und der extrazellulären Salzkonzentration (Abb. 25 A). *B. subtilis* ist demzufolge in der Lage die Menge an osmotischem Stress genau zu bestimmen und seinen internen Pool exakt daran anzupassen.

Diese Korrelation zwischen interner Prolinkonzentration und externem Salzgehalt wurde ebenfalls die von GWB120 abgeleiteten Mutanten DRB16, DRB17 (Abb. 25 B, C) sowie die von GWB128 abgeleiteten Mutanten DRB38 und DRB40 (Abb. 25 D, E) untersucht. Auch für diese repräsentativ ausgewählten Pro⁺-Suppressormutanten zeigte sich eine lineare Abhängigkeit zwischen intrazellulär akkumuliertem Prolin und extrazellulärer Salzkonzentration.

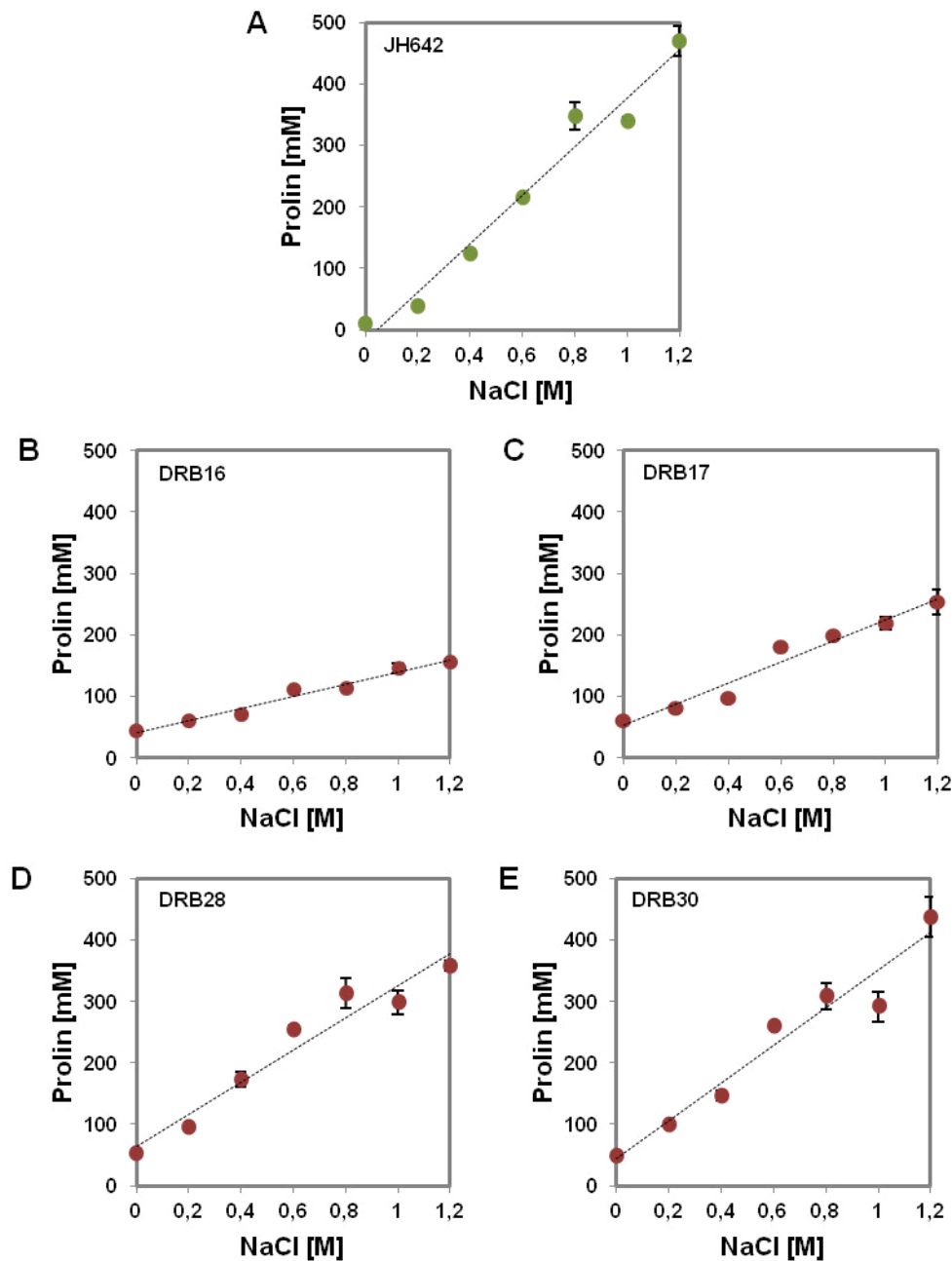


Abb. 25: Einfluss der externen Salzkonzentration auf die Höhe des intrazellulären Prolinpools

Der *B. subtilis* Wildtypstamm JH642 (A) und seine von GWB120 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$) und GWB128 ($\Delta proBA$, $rocR^*$) abgeleiteten Derivate DRB16 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$, $argC^*$), DRB17 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$, $ahrC^*$), DRB28 ($\Delta proBA$, $rocR^*$, $argC^*$) und DRB30 ($\Delta proBA$, $rocR^*$, $ahrC^*$) wurden bis zu einer OD_{578} von 1,8 bis 2 in SMM mit den angegebenen NaCl-Konzentrationen von 0 bis 1,2 M angezogen. Die Bestimmung des Prolingehaltes erfolgte nach der von Bates *et al.* (1973) beschriebenen Methode (4.4.2). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen berechnet. Die gepunktete Linie verdeutlicht die lineare Abhängigkeit zwischen dem intrazellulären Prolin und der extrazellulären NaCl-Konzentration.

5.2.10 Das Wachstum der Pro⁺-Suppressormutanten ist nicht allein von Prolin abhängig

Im Laufe der Untersuchungen des Wachstum und des Prolingehaltes der Pro⁺-Suppressormutanten fiel auf, dass die von GWB120 abgeleiteten Stämme gleich gut wuchsen wie der Wildtyp und deutlich besser wuchsen als die von GWB128 abgeleiteten Suppressormutanten (5.2.7), obwohl sie einen geringeren internen Prolinpool aufwiesen (5.2.8). Folglich stellte sich die Frage, ob der Wachstumsphänotyp, den wir bei diesen Pro⁺-Suppressorstämmen beobachten können, vollständig auf das intrazellulär akkumulierte Prolin zurückgeführt werden kann, oder ob hierbei noch weitere Einflüsse eine Rolle spielen. Zur Überprüfung der Prolinabhängigkeit des Wachstums wurde für alle zuvor untersuchten Suppressormutanten eine Deletion des *proHJ*-Operons vorgenommen. Bei einem Prolin-abhängigen Wachstum bei hoher Osmolarität würde man erwarten, dass die Suppressoren im Δ *proHJ*-Hintergrund den gleichen Phänotyp zeigen wie der Δ *proHJ*-Kontrollstamm selbst, da sie aufgrund des Fehlens der Proteine ProJ und ProH nicht dazu in der Lage sind das über den Arginin-Bypass-Weg synthetisierte γ -Glutamyl-Semialdehyd in Prolin umzuwandeln (Abb. 16 A) und folglich auch keinen osmoprotektiven Prolinpool ausbilden können.

Dies war für die von GWB128 abgeleiteten Stämme DRB112 und DRB113 (Abb. 26 B, E) sowie die von DRB4 abgeleiteten Stämme DRB114 und DRB115 (Abb. 26 C, F) auch der Fall. Sowohl das Wachstum als auch das intrazellulär akkumulierte Prolin glich der Δ *proHJ*-Mutante. Folglich ist der Wachstumsphänotyp dieser Stämme Prolin-abhängig.

Die von GWB120 abgeleiteten Suppressormutanten DRB110 und DRB111 zeigten zwar ein geringeres Wachstum als ihre Derivate ohne *proHJ*-Deletion, wuchsen aber trotzdem noch deutlich besser als die Δ *proHJ*-Mutante (Abb. 26 A). Auch bei der Untersuchung des Prolinpools beider Stämme zeigten sich Auffälligkeiten. Während der Stamm DRB110 ein ähnlich geringes Prolinlevel wie die Δ *proHJ*-Mutante zeigte, war der Stamm DRB111 immer noch dazu in der Lage 200 mM internes Prolin zu synthetisieren (Abb. 26 D).

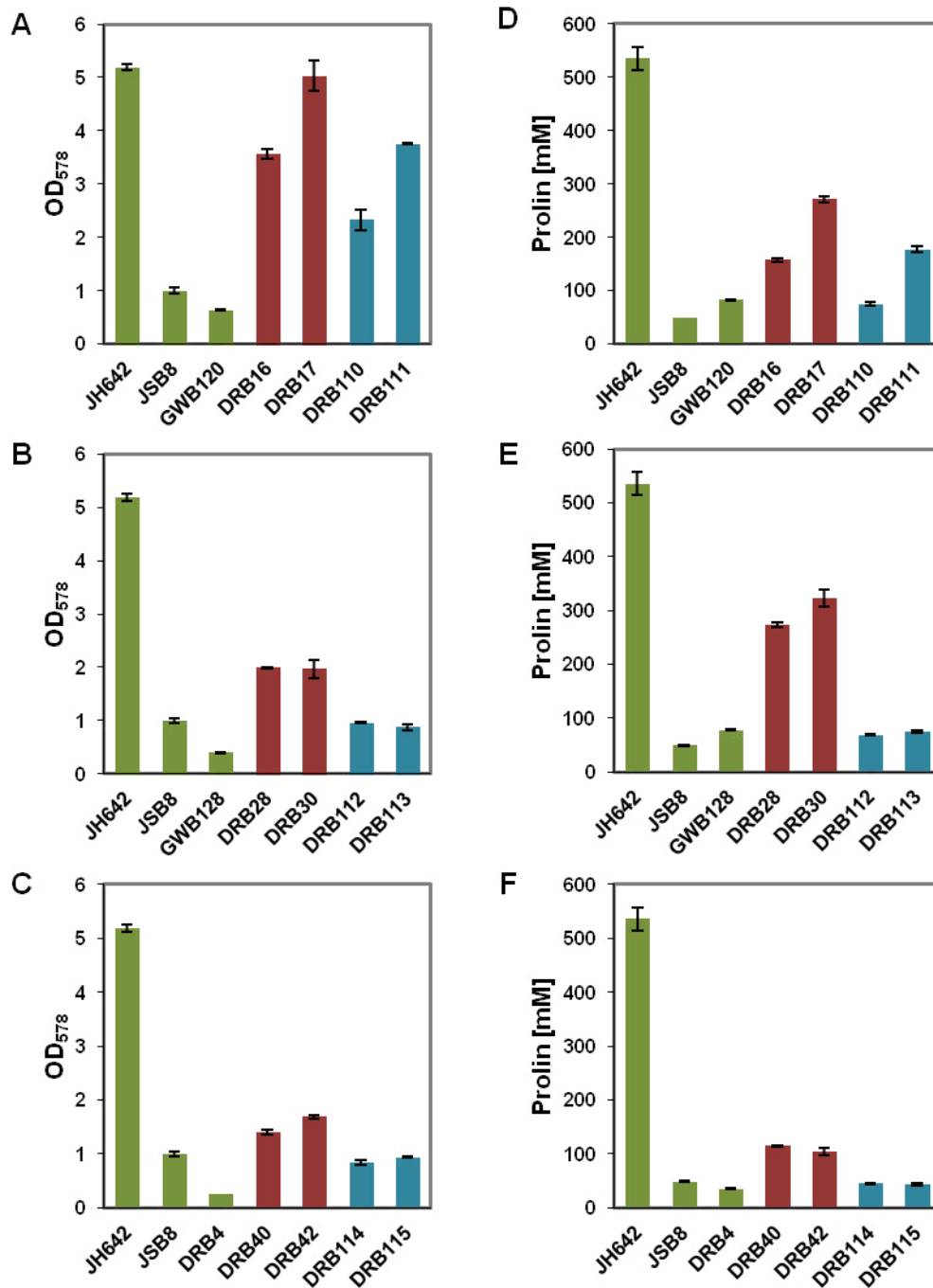


Abb. 26: Korrelation zwischen Wachstum osmotisch gestresster *B. subtilis* $\Delta proHJ$ -Mutanten und der Menge an intrazellulär akkumuliertem Prolin

(A-C) Der *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 und seine Derivate JSB8 ($\Delta proHJ$), GWB120 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$), DRB16 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$, $argC^*$), DRB17 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$, $ahrC^*$), DRB110 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$, $argC^*$, $\Delta proHJ$), DRB111 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$, $ahrC^*$, $\Delta proHJ$), GWB128 ($\Delta proBA$, $rocR^*$), DRB28 ($\Delta proBA$, $rocR^*$, $argC^*$), DRB30 ($\Delta proBA$, $rocR^*$, $ahrC^*$), DRB112 ($\Delta proBA$, $rocR^*$, $argC^*$, $\Delta proHJ$), DRB113 ($\Delta proBA$, $rocR^*$, $ahrC^*$, $\Delta proHJ$), DRB4 ($\Delta proA$), DRB40 ($\Delta proA$, $argC^*$), DRB42 ($\Delta proA$, $ahrC^*$), DRB114 ($\Delta proA$, $argC^*$, $\Delta proHJ$) und DRB115 ($\Delta proA$, $ahrC^*$, $\Delta proHJ$) wurden in SMM + 1,2 M NaCl kultiviert. Der Wachstumsertrag wurde nach 30 h photometrisch (OD_{578}) bestimmt. (D-F) Die Stämme wurden bis zu einer OD_{578} von 1,8 - 2 in SMM + 1,2 M NaCl angezogen. Die Bestimmung des Prolingehaltes erfolgte nach der von Bates *et al.* (1973) beschriebenen Methode (4.4.2). (A-B) Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen berechnet. Kontroll- und Ausgangsstämme sind in grün, Pro^+ -Suppressormutanten in rot und Pro^+ -Suppressormutanten im $\Delta proHJ$ -Hintergrund in blau dargestellt.

Es lag die Vermutung nahe, dass im Stamm DRB111 die Funktion des fehlenden Proteins ProH durch die Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase ProG übernommen wird (Abb. 16 A), welche leicht osmotisch induziert (Nicolas *et al.*, 2012) ist und die Reduktion von Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat zu Prolin katalysiert (Belitsky *et al.*, 2001).

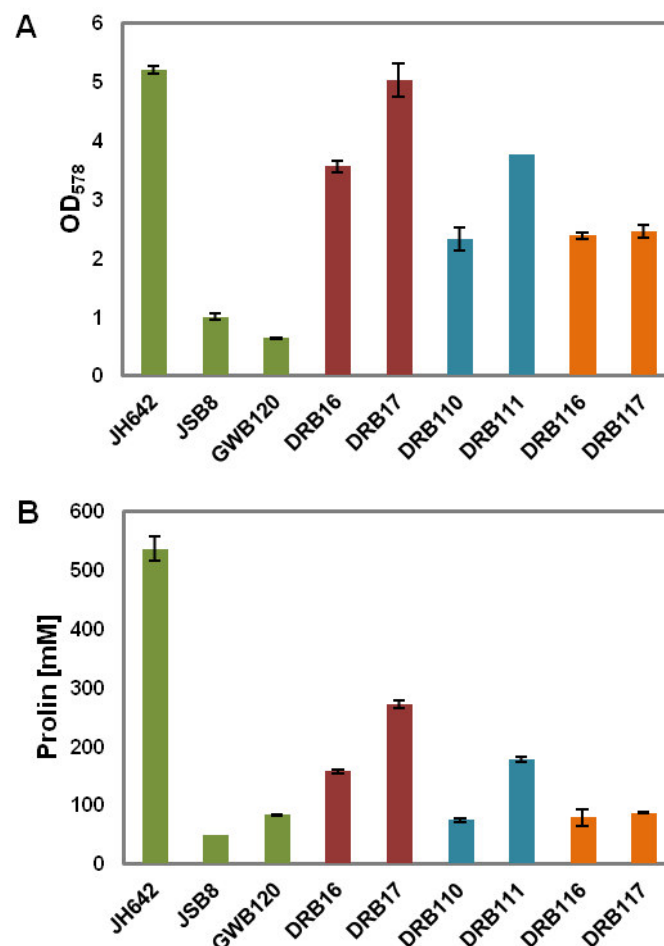


Abb. 27: Korrelation zwischen Wachstum osmotisch gestresster *B. subtilis* $\Delta proHJ/proG$ -Mutanten und der Menge an intrazellulär akkumuliertem Prolin

(A) Der *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 und seine Derivate JSB8 ($\Delta proHJ$), GWB120 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$), DRB16 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$, $argC^*$), DRB17 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$, $ahrC^*$), DRB110 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$, $argC^*$, $\Delta proHJ$), DRB111 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$, $ahrC^*$, $\Delta proHJ$), DRB116 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$, $argC^*$, $\Delta proHJ$, $\Delta proG$) und DRB117 ($\Delta proBA$, $rocDEF^*$, $ahrC^*$, $\Delta proHJ$, $\Delta proG$) wurden in SMM + 1,2 M NaCl kultiviert. Der Wachstumsertrag wurde nach 30 h photometrisch (OD₅₇₈) bestimmt. (B) Die Stämme wurden bis zu einer OD₅₇₈ von 1,8 - 2 in SMM + 1,2 M NaCl angezogen. Die Bestimmung des Prolingehaltes erfolgte nach der von Bates *et al.* (1973) beschriebenen Methode (4.4.2). (A-B) Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen berechnet. Kontroll- und Ausgangsstämme sind in grün, Pro⁺-Suppressormutanten in rot, die Pro⁺-Suppressormutanten im $\Delta proHJ$ -Hintergrund in blau und die Pro⁺-Suppressormutanten im $\Delta proHJ/proG$ -Hintergrund in orange dargestellt.

Um eine endgültige Aussage über die Prolinabhängigkeit des Wachstums der von GWB120 abgeleiteten Suppressormutanten zu treffen, musste neben dem *proHJ*-Operon auch das *proG*-Gen deletiert werden (Abb. 27). Der hierbei entstandenen Stämme DRB116 und DRB117 waren beide nicht in der Lage einen osmoprotektiven intrazellulären Prolinpool aufzubauen (Abb. 27 B). ProG hatte also einen Anteil am erhöhten Prolinpool (Abb. 27 B) und Wachstum (Abb. 27 A) des Stammes DRB111.

Trotz der geringen Prolinpools waren die $\Delta proHJ/proG$ -Mutanten DRB116 und DRB117 dazu in der Lage unter Hochsalzbedingungen zu wachsen (Abb. 27 A). Folglich konnte der Wachstumsphänotyp für die von GWB120 abgeleiteten Pro⁺-Suppressormutanten nicht einzig und allein auf das intrazellulär akkumulierte Prolin zurückgeführt werden. Es musste noch ein weiterer Faktor vorhanden sein, welcher diesen Stämmen das Wachstum unter Hochsalzbedingungen ermöglicht. Die Quantifizierung der intrazellulären Pools der Aminosäuren Arginin, Glutamat und Ornithin mittels HPLC-Analytik, welche allesamt am *argC*-Bypass-Weg für die Prolinbiosynthese in den Pro⁺-Suppressormutanten beteiligt sind (Abb. 16 A), konnte einen entscheidenden Hinweis geben. So war der Argininpool in den von GWB120 abgeleiteten Suppressormutanten unter Hochsalzbedingungen (1,2 M) deutlich erhöht (Abb. 28). Die von GWB128 und DRB4 abgeleiteten Suppressormutanten zeigten gegenüber des Wildtypstammes JH642 nur eine leichte Erhöhung (Abb. 28). Die internen Glutamat- und Ornithin-Pools zeigten keine Auffälligkeiten (Ergebnisse nicht gezeigt).

Mikroorganismen akkumulieren unter hyperosmotischem Stress kompatiblen Solute, darunter auch die Aminosäuren Glutamat, Prolin und Ectoin. Für verschiedene Spezies konnte die protektierende Wirkung der Aminosäure Arginin gezeigt werden (Holmstrup *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2011; Babu *et al.*, 2005; Hien *et al.*, 2003; Alpaslan *et al.*, 1999; Dubey *et al.*, 1989). Es ist nahe liegend, dass Arginin auch in *B. subtilis* eine osmoprotektierende Wirkung übernehmen kann. Auf Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten HPLC-Messungen kann angenommen werden, dass das Wildtyp-ähnliche Wachstum der von GWB120 abgeleiteten Suppressormutanten DRB16 und DRB17 nicht einzig und allein auf die Akkumulation von Prolin, sondern eventuell auch auf die Akkumulation der Aminosäure Arginin zurückzuführen ist.

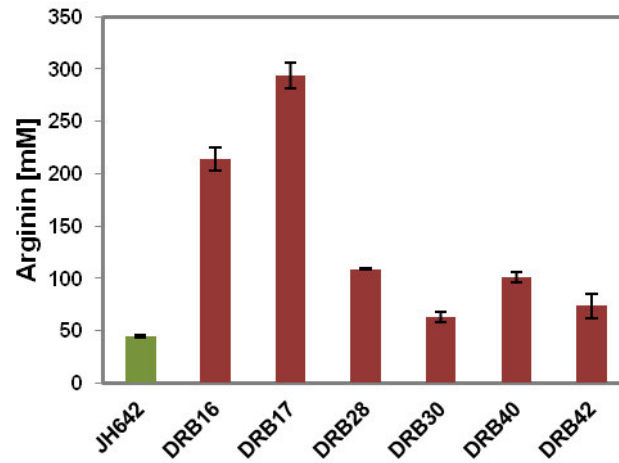


Abb. 28: Arginingehalt osmotisch gestresster *B. subtilis*-Pro⁺-Suppressormutanten

Der *B. subtilis*-Wildtypstamm JH642 und seine Derivate DRB16 ($\Delta proBA$, $rocDEF^+$, $argC^+$), DRB17 ($\Delta proBA$, $rocDEF^+$, $ahrC^+$), DRB28 ($\Delta proBA$, $rocR^+$, $argC^+$), DRB30 ($\Delta proBA$, $rocR^+$, $ahrC^+$), DRB40 ($\Delta proA$, $argC^+$) und DRB42 ($\Delta proA$, $ahrC^+$) wurden bis zu einer OD₅₇₈ von 1,8 - 2 in SMM + 1,2 M NaCl angezogen. Die Bestimmung des Arginingehaltes erfolgte mittels HPLC-Analyse (4.4.3). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei biologischen und zwei technischen Parallelen berechnet. Der Wildtypkontrollstamm ist in grün und die Pro⁺-Suppressormutanten sind in rot dargestellt.

6 Diskussion

Für das Wachstum und die Vermehrung von Mikroorganismen ist die Verfügbarkeit von Wasser ein entscheidender Parameter (Galinski und Trüper, 1994; Potts, 1994). Der Bodenbakterium *B. subtilis* ist in seinem natürlichen Habitat häufigen Schwankungen der Osmolarität und folglich auch einer wechselnden Wasserverfügbarkeit ausgesetzt (Bremer, 2002; Ventosa *et al.*, 1998; Miller und Wood, 1996; Galinski und Trüper, 1994). Um einem Wasserausstrom aus der Zelle und einem damit verbundenen Abfall des Zellurgors entgegen zu wirken, werden unter hochosmolaren Umweltbedingungen kompatible Solute im Zellinneren angereichert (Bremer, 2002; Kempf und Bremer, 2000; Galinski, 1993). Die Akkumulation dieser osmotischen Schutzsubstanzen ist in allen Domänen des Lebens verbreitet (Bremer und Krämer, 2000; Roberts, 2000; Sakamoto und Murata, 2000; Burg und Kültz, 1997; Hohmann, 1997). *B. subtilis* nutzt ein breites Spektrum kompatibler Solute (Hoffmann und Bremer, 2011). Die Aminosäure Prolin nimmt eine besondere Rolle in der Osmoprotektion von *B. subtilis* ein, da es sich um das einzige kompatible Solut handelt, welches *de novo* von der Zelle synthetisiert werden kann (Brill *et al.*, 2011 b).

6.1 Der Biosyntheseweg der osmotischen Schutzsubstanz Prolin

Die „*de novo*“-Synthese der Aminosäure Prolin in *B. subtilis* erfolgt wie in den meisten Bakterien ausgehend von Glutamat und involviert drei Enzyme: Die γ -Glutamyl-Kinase (ProB, ProJ), die γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase (ProA) und die Δ^1 -Pyrrolin-Carboxylat-Reduktase (ProI, ProH) (Belitsky *et al.*, 2001). In *B. subtilis* erfüllt Prolin neben seiner Funktion als proteinogene Aminosäure eine wichtige Aufgabe als osmotische Schutzsubstanz. Die für die anabole und osmoadaptive Zwecke benötigten Prolinmengen unterscheiden sich hierbei erheblich (Brill *et al.*, 2011 a; Brill *et al.*, 2011 b; Whatmore *et al.*, 1990). Um den Anforderungen für die jeweilige Funktion gerecht zu werden, besitzt *B. subtilis* zwei unterschiedliche Wege für die Prolinbiosynthese. Der anabole Weg, welcher Prolin für die Proteinsynthese bereit stellt, wird durch die Enzyme ProB, ProA und ProI katalysiert und ist homolog zum ProB-ProA-ProC-Weg aus *E. coli* (Hayzer und Leisinger, 1980; Baich, 1969). Für die Proteinbiosynthese werden nur

moderate Prolin pools benötigt. Aus diesem Grund ist die anabole Prolinbiosynthese sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene streng reguliert. Die Expression des *proBA*-Operons und des Gens *proI* in *B. subtilis* wird durch eine T-Box-abhängige transkriptionelle Antitermination kontrolliert und lediglich durch einen Prolinmangel induziert (Brill *et al.*, 2011 a). Auf Proteinebene wird die anabole Prolinbiosynthese durch allosterische Feedback-Inhibition des ProB-Enzyms durch das Endprodukt Prolin reguliert (Chen *et al.*, 2007). Schon bei Konzentrationen von $7,5 \cdot 10^{-6}$ M reduziert sich die Aktivität von ProB um die Hälfte (Chen *et al.*, 2007). Die strenge Regulation des ProB-ProA-Prol-Weges ist an den spezifischen Bedarf der Zelle für anabole Zwecke angepasst und vermeidet eine verschwenderische und energetisch kostenintensive Überproduktion der Aminosäure Prolin. So sind für die Synthese eines einzigen Prolinmoleküls 20 hochenergetische Phosphatbindungen notwendig (Akashi und Gojobori, 2002). Unter hyperosmotischen Wachstumsbedingungen ist hingegen die Akkumulation sehr großer Prolinmengen notwendig, um ein Überleben der Zelle zu sichern. Entsprechend dieser physiologischen Anforderung unterliegt die Expression des *proHJ*-Operons keiner T-Box-Regulation, sondern wird osmotisch induziert (Brill *et al.*, 2011 b). Darüber hinaus kann das ProJ-Enzym des osmoadaptiven Biosyntheseweges keine signifikante allosterische Regulation durch Prolin aufweisen, da ansonsten Prolin pools bis zu 500 mM gar nicht generiert werden könnten (Brill *et al.*, 2011 b).

Die Proteine ProJ und ProH, welche den jeweils ersten und letzten Schritt der osmoadaptiven Prolinbiosynthese in *B. subtilis* katalysieren, sind Isoenzyme der anabolen ProB- und ProI-Proteine. Für die γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase ProA liegt hingegen kein paraloges Enzym vor. Folglich sind beide Prolinbiosynthesewege in *B. subtilis* durch das gemeinsam genutzte ProA miteinander verbunden und können nicht unabhängig voneinander operieren.

Nicht alle Bakterien zeigen eine solche Verknüpfung des anabolen und osmoadaptiven Prolinsyntheseweges, wie der in dieser Arbeit untersuchte Modellorganismus *B. subtilis*.

So besitzt das Gram-positive Bakterium *B. licheniformis* zwei ProA-Homologe, welche als ProA und ProAA annotiert sind (Schroeter *et al.*, 2013; Dolezal, 2006). Äquivalent zu *B. subtilis* sind in diesem Vertreter der Gattung *Bacillus* das *proB*- und das *proA*-Gen in einem Operon organisiert, wobei *proA* stromabwärts von *proB*

lokalisiert ist (Schroeter *et al.*, 2013; Dolezal, 2006). Das *proAA*-Gen ist hingegen stromabwärts von *proH* und *proJ* lokalisiert und bildet mit diesen beiden Genen ein osmotisch induziertes Operon (Schroeter *et al.*, 2013; Dolezal, 2006). Folglich ist *B. licheniformis* dazu in der Lage, die Prolinbiosynthese für anabole Zwecke gänzlich von der osmoadaptiven Prolinbiosynthese zu trennen (Schroeter *et al.*, 2013).

Diese Entwicklung paralleler Prolinsynthesewege für anabole und osmoprotektive Zwecke ist in *Bacilli* verbreitet (5.1.1). So zeigen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten bioinformatischen Analysen, dass neben *B. subtilis* z.B. auch *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis* und *B. valismortis* eine durch ProA vermittelte Verknüpfung beider Prolinbiosynthesewege aufweisen und kein um *proAA* verlängertes *proHJ*-Operon enthalten (5.1.1). Ein zusätzliches *proAA*-Gen und damit unabhängig voneinander agierende Prolinbiosynthesewege konnten neben *B. licheniformis* z.B. auch für *B. megaterium*, *B. pseudofirmus* und *B. pumilus* gezeigt werden (5.1.1).

Während Bakterien des *B. subtilis*- oder des *B. licheniformis*-Typs Prolin über zwei parallele Wege herstellen (Schroeter *et al.*, 2013), nutzen andere bakterielle Vertreter vollkommen unterschiedliche Routen für die anabole und die osmoadaptive Prolinbiosynthese. So bildet das Bakterium *Halobacillus halophilus* Prolin für osmoadaptive Zwecke ausgehend von Glutamat durch die Enzyme ProJ, ProA und ProH, welche in einem Operon organisiert sind und osmotisch induziert werden (Saum und Müller, 2007). Die anabole Prolinbiosynthese in *Halobacillus halophilus* erfolgt hingegen ausgehend von Glutamat über Ornithin. Ornithin wird dabei entweder direkt durch die Ornithin-Cyclodeaminase ArcB oder indirekt durch die Ornithin-Aminotransferase RocD und Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase ProC in Prolin umgewandelt (Köcher *et al.*, 2011).

Auch Pflanzen besitzen zwei vollkommen unterschiedliche Wege für die Prolinbiosynthese. Zum einen synthetisieren sie Prolin aus Glutamat. Dieser Syntheseweg ist homolog zu dem für *B. subtilis* beschriebenen Weg. Die ersten beiden Schritte der Prolinbiosynthese werden hierbei durch ein bifunktionelles Enzym, die Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase, katalysiert (Hu *et al.*, 1992). Die enzymatischen Domänen der Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase weisen sowohl γ -Glutamyl-Kinase- als auch γ -Glutamyl-Phosphate-Reduktase-Aktivität auf und entsprechen damit dem ProB und ProA aus *B. subtilis*. Der letzte Schritt der

Prolinbiosynthese wird ebenfalls äquivalent zur bakteriellen Synthese durch eine Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase katalysiert. Zum anderen sind Pflanzen dazu in der Lage Prolin aus Ornithin zu synthetisieren (Delauney *et al.*, 1993). Hierbei wird Ornithin mittels der Ornithin- δ -Aminotransferase zu γ -Glutamyl-Semialdehyd umgewandelt, welches durch eine spontane Reaktion zu Pyrrolin-5-Carboxylat kondensiert (Delauney *et al.*, 1993). Das Pyrrolin-5-Carboxylat wird über den Glutamatweg schließlich mittels der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase zu Prolin umgesetzt (Delauney und Verma, 1990). Untersuchungen im pflanzlichen Modellorganismus *V. aconitifolia* haben gezeigt, dass die Expression der Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase unter hyperosmotischen Bedingungen gesteigert ist (Hu *et al.*, 1992). Auch für den pflanzlichen Modellorganismus *A. thaliana* konnte die Induktion der Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase-Expression unter hyperosmotischen Bedingungen gezeigt werden (Yoshida *et al.*, 1995). Die Ornithin- δ -Aminotransferase ist hingegen nicht osmotisch induziert (Delauney *et al.*, 1993). Folglich ist anzunehmen, dass in Pflanzen die anabole Prolinbiosynthese über Ornithin erfolgt (Delauney *et al.*, 1993), während die Prolinproduktion für osmoprotektive Zwecke über den Glutamatweg sichergestellt wird. Auch die pflanzliche Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase unterliegt, wie das ProB-Enzym aus *B. subtilis*, einer allosterischen Endprodukthemmung durch Prolin (Hu *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1995). Die Aktivität der Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase aus *V. aconitifolia* ist in Anwesenheit von 6 mM Prolin zu 50 % inhibiert (Hu *et al.*, 1992) und folglich um ein Vielfaches weniger sensitiv als bakterielle Glutamyl-Kinase. Unter osmotischem Stress akkumulieren Pflanzen jedoch 129 mM Prolin im Zytosol (Delauney und Verma, 1993). Diese Konzentration müsste eine vollständige Inhibition der Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase bewirken. Im Gegensatz zu *B. subtilis* verfügen Pflanzen nicht über einen osmoadaptiven Prolinbiosyntheseweg, der parallel zu dem durch die Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase und die Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase vermittelten Weg verläuft. Es ist möglich, dass die pflanzliche Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase unter hyperosmotischen Bedingungen eine Konformationsänderung absolviert, welche die Feedback-Inhibition durch Prolin deutlich verringert (Hong *et al.*, 2000).

6.2 Die allosterische Regulation der γ -Glutamyl-Kinase

Die γ -Glutamylkinasen ProB und ProJ, welche den ersten Schritt der Prolinbiosynthese in *B. subtilis* katalysieren, unterscheiden sich maßgeblich in ihren biochemischen Eigenschaften. Das anabole ProB-Enzym wird mittels Feedback-Inhibition durch das Endprodukt Prolin kontrolliert, während das osmoadaptive ProJ-Enzym offensichtlich keiner signifikanten allosterischen Regulation durch Prolin unterliegt.

In der Literatur sind zahlreiche Aminosäure-Substitutionen in prokaryotischen γ -Glutamyl-Kinasen und eukaryotischen Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetasen beschrieben, welche die Endprodukthemmung durch Prolin vermindern oder gänzlich aufheben und aufgrund einer gesteigerten Prolinakkumulation eine erhöhte Osmotoleranz aufweisen. Es liegen unter anderem Untersuchungen für die prokaryotischen γ -Glutamyl-Kinasen von *E. coli* (Czonka *et al.*, 1988; Dandekar und Uratsu, 1988; Rushlow *et al.*, 1985), *Serratia marcescens* (Omori *et al.*, 1992), *Thermus thermophilus* (Kosuge und Hoshino, 1998), *Listeria monocytogenes* (Sleator *et al.*, 2001), *Streptococcus thermophilus* (Massarelli *et al.*, 2000), *Halobacillus halophilus* (Saum und Müller, 2007) und *B. subtilis* (Miao *et al.*, 2002) sowie die eukaryotischen Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase aus *Vigna aconitifolia* (Zhang *et al.*, 1995) und *Lycopersicon esculentum* (Fujita *et al.*, 2003; Maggio *et al.*, 2002) vor.

Das ProB-Enzym aus *E. coli* ist die bisher am besten untersuchte γ -Glutamyl-Kinase. Die funktionelle Einheit des *E. coli*-Enzyms ist ein Tetramer bestehend aus zwei Dimeren (Perez-Arellano *et al.*, 2010 b). Untersuchung der Kristallstruktur der γ -Glutamyl-Kinase ProB aus *E. coli* zeigen, dass die Bindestelle des Inhibitors Prolin und des Substrates Glutamat teilweise im aktiven Zentrum des Enzyms überlappen (Perez-Arellano *et al.*, 2006; Perez-Arellano *et al.*, 2010 b). Die Interaktion von Inhibitor und Substrat mit der γ -Glutamyl-Kinase wird durch einen 16 Aminosäuren langen flexiblen Loop moduliert, welcher das β -Faltblatt 4 und die α -Helix E miteinander verbindet. Ein Großteil der beschriebenen Aminosäure-Substitutionen, welche die Feedback-Hemmung des Enzyms mindern, clustert in einer sehr kleinen Region im Bereich des flexiblen Loops (Perez-Arellano *et al.*, 2010 b).

Das Glutamat an der Position 143 des *E. coli*-Enzyms ist Teil dieses Loops. Ein Austausch dieses negativen Aminosäure-Restes gegen die neutrale Aminosäure Alanin (E143A) bewirkt eine 400-mal geringere Sensitivität gegenüber Prolin und erlaubt eine 250-fach höhere Prolinakkumulation der Mutante vergleichend zum Wildtypstamm (Dandekar und Uratsu, 1988). Der Austausch des negativen Glutamatrestes an der Position 143 des *E. coli*-ProB-Enzyms gegen die positive Aminosäure Lysin (E143K) führt ebenfalls zu einer drastisch verminderten Feedback-Inhibition durch Prolin. Selbst in Anwesenheit von 500 mM Prolin zeigte das mutierte Enzym eine uneingeschränkte Funktion (Veeravalli *et al.*, 2011).

Auch das durch Prolin Feedback-inhibierte Enzym ProB aus *B. subtilis* (Chen *et al.*, 2007) weist einen negativen Glutamat-Rest (E142) an der entsprechenden Position im flexiblen Loop auf, während das ProJ-Protein einen positiv geladenen Arginin-Rest (R146) an dieser Position zeigt. Es liegt die Vermutung nahe, dass das ProJ-Enzym aus *B. subtilis* aufgrund des positiven Aminosäurerestes (R146) im Vergleich zu ProB atypische allosterische Eigenschaften aufweist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte geklärt werden, dass die allosterische Regulation maßgeblich durch den negativen Aminosäurerest an der Position 142 des ProB-Enzyms vermittelt wird (5.1.5). Die Untersuchungen zeigen, dass der Austausch der negativen Aminosäure Glutamat gegen die positive Aminosäure Arginin in ProB (E142R) zu einer Verminderung der allosterischen Regulation (5.1.5) durch Prolin führt, welche eine gesteigerte Prolinakkumulation (5.1.4) sowie eine erhöhte Osmotoleranz (5.1.3) mit sich bringt. Äquivalent dazu bewirkt der Austausch der positiven Aminosäure Arginin gegen die negative Aminosäure Glutamat in ProJ (R146E) eine gesteigerte Feedback-Regulation dieses zuvor kaum allosterisch regulierten Proteins und geht mit einem Absinken der Prolinakkumulation (5.1.4) sowie einer verminderten Osmotoleranz (5.1.3) einher. Folglich lassen sich ProB und ProJ durch den Austausch einer einzigen Aminosäure im flexiblen Loop der γ -Glutamyl-Kinase ineinander umwandeln. Der flexible Loop enthält viele konservierte Aminosäure-Reste, welche sowohl mit Prolin als auch mit Glutamat interagieren. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass die Bindestellen für das Substrat Glutamat und den Inhibitor Prolin im aktiven Zentrum des Enzyms überlappen (Perez-Arellano *et al.*, 2010). Desweiteren konnte der Strukturenvergleich

der γ -Glutamyl-Kinasen aus *E. coli* (PDB Code 2J5V) und *C. jejuni* (PDB Code 2AKO), welche mit unterschiedlichen Substraten komplexiert sind, die Existenz signifikanter Variationen hinsichtlich der Konformation des flexiblen Loops aufzeigen. So führt die abweichende Loop-Konformation in *C. jejuni* zu einer engeren Prolinbindestelle und zu einer verbesserten Prolinbindung (Perez-Arellano *et al.*, 2010). Untersuchungen haben gezeigt, dass Substitutionen von Aminosäureresten im flexiblen Loop, welche nicht im direkten Kontakt zu Prolin oder Glutamat stehen, zu einer signifikanten Veränderung der Bindeaffinität von Prolin und Glutamat führen (Perez-Arellano *et al.*, 2010). Gleiches gilt für Aminosäuresubstitutionen in benachbarten Sekundärstrukturen (Perez-Arellano *et al.*, 2010). Auch der in dieser Arbeit durchgeführte Aminosäure-Austausch im flexiblen Loop von ProB und ProJ aus *B. subtilis* betrifft Aminosäuren, welche nicht im direkten Kontakt zu Glutamat oder Prolin stehen (5.1.6). Die in dieser Arbeit und vorangegangenen Untersuchungen charakterisierten Mutationen modulieren aller Wahrscheinlichkeit nach die Konformation des flexiblen Loops und des aktiven Zentrums und beeinflussen hierbei indirekt die Ligandenbindung an das Enzym. Dabei erlangt entweder Prolin oder Glutamat eine bessere Passgenauigkeit hinsichtlich der Bindetasche im aktiven Zentrum des Enzyms. Im Gegensatz zu Prolin besitzt Glutamat eine zusätzliche γ -Carboxyl-Gruppe, die zu einem großen Teil außerhalb der Prolinbindestelle lokalisiert ist. Dieser Unterschied könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, warum eine Modulation des aktiven Zentrums die Interaktion zwischen dem Enzym und Prolin bzw. Glutamat auf eine unterschiedliche Art und Weise beeinflusst.

Die in der vorliegenden Arbeit erfassten Daten decken sich mit bereits in der Literatur beschriebenen Substitutions-Mutanten, welche ebenfalls einen Austausch des Glutamats an der entsprechenden Stelle des ProB-Enzyms aufweisen. So führt der Aminosäureaustausch (E146K) im Gram-positiven Pathogen *Listeria monocytogenes* zu einem Absinken der Feedback-Inhibition, einer Prolinüberproduktion und einer erhöhten Osmotoleranz (Sleator *et al.*, 2001). Dieses Phänomen ist jedoch nicht nur unter Prokaryonten verbreitet. Für die γ -Glutamyl-Kinase *tomPRO1* aus der Tomate *Lycopersicon esculentum* konnten gleich drei verschiedene Mutanten an der entsprechenden Position isoliert werden. Die Substitution der negativen Aminosäure Glutamat gegen die positive Aminosäure Lysin (E153K) führte zu einer 3500-fachen Reduktion des K_i -Wertes für Prolin und zu

einer 900-fachen Zunahme des Prolingehaltes in den Zellen (Fujita *et al.*, 2003). Durch den Austausch des Glutamats gegen eine neutrale Aminosäure wie Alanin (E153A) oder Glycin (E153G) konnte hingegen nur eine 550-fache Reduktion des K_i -Wertes für Prolin und eine 300-fach gesteigerte intrazelluläre Prolinakkumulation erzielt werden (Fujita *et al.*, 2003). Für den eukaryotischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* wurde ebenfalls eine Mutante beschrieben, welche aufgrund ihrer Aminosäuresubstitution in der γ -Glutamyl-Kinase *PRO1* (E149K) vergleichend zum Wildtyp eine 1500-fache verringerte Sensitivität gegenüber Prolin zeigten und dazu in der Lage waren 30-fach höhere Prolinlevel zu akkumulieren (Sekine *et al.*, 2007). Diese Beispiele für Substitutionsmutanten sowie die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten verdeutlichen, dass der negative Glutamat-Rest eine Schlüsselrolle in der Prolin-vermittelten Feedback-Inhibition sowohl von prokaryotischen als auch eukaryotischen γ -Glutamyl-Kinasen einnimmt.

Anhand bioinformatischer Analysen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Art der Aminosäure an der Position 142 der ProB-Glutamat-Kinase und der Position 146 der ProJ-Glutamat-Kinase innerhalb der Gattung *Bacillus* hoch konserviert ist (5.1.1). Die Untersuchung von 85 *Bacillus*-Genomen zeigte, dass alle durch Prolin allosterisch regulierten ProB-Proteine die negativ geladene Aminosäure Glutamat an dieser Position aufweisen, während alle nicht Feedback-regulierten ProJ-Proteine den positiven Aminosäure-Rest Arginin an dieser Position zeigen (5.1.1). Ausnahmen im Rahmen dieser Analyse stellen die Stämme *B. marmarensis* und *B. wakoensis* dar, welche anstatt des positiven Arginins den neutralen Aminosäure-Rest Glutamin an der Position 146 des ProJ-Enzyms aufweisen (5.1.1). Analog zu diesen beiden bakteriellen Vertretern konnte für das Stickstoff-fixierende Bakterium *Sinorhizobium meliloti*, das Schwefel-oxidierende Bakterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*, den Schimmelpilz *Ashbya gossypii* und weitere Pro- und Eukaryonten eine neutrale Aminosäure an der entsprechenden Position gezeigt werden (Fichmann *et al.*, 2015). Die Bedeutung dieser neutralen Aminosäure ist bisher unklar. Untersuchungen von Fujita *et al.* (2003) deuten jedoch darauf hin, dass eine positive Aminosäure eine deutlich stärkere Abnahme der Feedback-Inhibition, eine höhere Prolinakkumulation und eine damit einhergehende größere osmotische Toleranz erlaubt als eine neutrale Aminosäure an dieser Position.

Der Sequenzvergleich bakterieller γ -Glutamyl-Kinasen und pflanzlicher Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetasen offenbart ebenfalls einen interessanten Unterschied hinsichtlich der Art der Aminosäure an der Position 142 (bezogen auf ProB aus *B. subtilis*) des Enzyms. Alle bifunktionellen pflanzlichen Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetasen, z.B. aus *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* oder *Oryza sativa*, zeigen einen positiv geladenen Aminosäurerest an dieser Stelle (R oder K) (Fichmann *et al.*, 2015), während die meisten monofunktionellen bakteriellen γ -Glutamyl-Kinasen, z.B. aus *Escherichia coli*, *Streptococcus thermophilus* und *Serratia marcescens*, äquivalent zum ProB aus *B. subtilis* einen negativ geladenen Aminosäurerest (E oder D) an dieser Position aufweisen (Fujita *et al.*, 2003). Darüber hinaus gibt es auch einige monofunktionelle bakterielle γ -Glutamyl-Kinasen, wie z.B. die GKII von *Shewanella* und *Alteromonas macleodi*, die äquivalent zum ProJ aus *B. subtilis* einen positiv geladenen Aminosäurerest an dieser Stelle besitzen (Fichmann *et al.*, 2015). Studien haben gezeigt, dass bakterielle γ -Glutamyl-Kinasen und pflanzliche Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetasen sehr unterschiedliche Sensitivitäten hinsichtlich ihrer Feedbackregulation durch Prolin aufweisen. Bakterielle Enzyme zeigen bereits bei Konzentrationen von 0,01 bis 0,1 mM Prolin eine 50%ige Inhibition ihrer Aktivität (Omori *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1984). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte in Anwesenheit von 0,1 mM Prolin bereits eine um rund 35 % verminderte Enzymaktivität für das ProB-Enzym aus *B. subtilis* ermittelt werden (5.1.5). Pflanzliche Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetasen erreichen eine um 50 % verminderte Aktivität hingegen erst bei Konzentrationen von mehr als 5 mM Prolin (Zhang *et al.*, 1995). Dieser Sachverhalt unterstreicht erneut die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse: Der negativ geladene Aminosäurerest spielt eine wichtige Rolle für die allosterische Regulation der bakteriellen γ -Glutamyl-Kinasen. Dementsprechend bewirkt der positive Aminosäurerest in pflanzlichen Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetasen und in einigen monofunktionellen bakteriellen γ -Glutamyl-Kinasen deren verminderte Feedback-Inhibition durch Prolin. Es ist denkbar, dass Pflanzen im Laufe der Evolution einen Aminosäurerest an dieser Position in der Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase fixiert haben, welcher die allosterische Regulation der Prolinsynthese herabsetzt, um sich durch eine verstärkte Prolinakkumulation optimal an osmotischen Stress anzupassen (Fujita *et al.*, 2003). Phylogenetische Analysen zeigen, dass die γ -Glutamyl-Kinase und die

γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase, welche durch den *tomPRO1*-Genlocus in der Tomate kodiert werden, erstaunlicherweise eher den prokaryotischen als den eukaryotischen Enzymen ähnlich sind. Hierbei liegt die Vermutung nahe, dass die γ -Glutamyl-Kinase durch horizontalen Gentransfer aus Prokaryoten in das Tomaten-Genom aufgenommen wurde (Fujita *et al.*, 1998). Das ProJ-Enzym aus *B. subtilis* ist aufgrund der positiven Aminosäure Arginin an der Position 146 des Enzyms den pflanzlichen Enzymen ähnlicher.

Neben den zahlreichen Untersuchungen von Aminosäure-Substitutionen in bakteriellen γ -Glutamyl-Kinasen und pflanzlichen Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetasen, gibt es auch Berichte über künstliche Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetasen, welche durch die Fusion der bakteriellen γ -Glutamyl-Kinase und bakteriellen γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase aus *E. coli* und *B. subtilis* entstanden sind und ebenfalls zu einer Verringerung Feedback-Inhibition und einer damit einhergehenden gesteigerten Prolinakkumulation und Osmotoleranz führen (Liu *et al.*, 2005; Meijer *et al.*, 1996). Diese Beobachtungen sind folgendermaßen zu erklären: Das im ersten Schritt der Prolinbiosynthese entstehende γ -Glutamyl-Phosphat ist extrem labil und liegt *in vivo* daher ausschließlich in Enzym-gebundener Form vor. In Mikroorganismen bilden die Glutamylkinase ProB und die Glutamyl-Phosphat-Reduktase ProA einen Enzymkomplex, um einen direkten Transfer des labilen Intermediates zu ermöglichen und eine Freisetzung in das Zytoplasma der Zelle zu verhindern (Smith *et al.*, 1984). Es kann davon ausgegangen werden, dass durch die Erzeugung eines Fusionsenzym eine räumliche Dichte zwischen den aktiven Zentren von γ -Glutamyl-Kinase und γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase erzeugt wird, welche den Transfer des labilen Intermediates erleichtert und dessen Zerfall verhindert (Chen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2006). Da in Pflanzen ProB und ProA durch die bifunktionelle Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase ersetzt werden erübrigt sich die Komplexbildung (Hu *et al.*, 1992).

6.3 Überlappung der Prolinbiosynthese und des Argininmetabolismus

Der anabole und der osmoadaptive Prolinbiosyntheseweg in *B. subtilis* sind über die γ -Glutamylphosphat-Reduktase ProA miteinander verbunden. Da kein paraloges Enzym existiert, führt der Verlust von ProA zu Störungen in der Prolinbiosynthese.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *B. subtilis* durch die Akkumulation von Suppressormutationen, welche Proteine des Argininanabolismus betreffen, in der Lage ist derartige Störungen in der Prolinbiosynthese durch eine schnelle Anpassung erfolgreich zu überwinden (5.2.1). Zwei Klassen von Suppressormutanten konnten charakterisiert werden: Zum einen Mutationen in der Promotorregion von des *argC*-Operons, welches für Gene der Argininsynthese kodiert, und zum anderen Mutationen im Regulatorprotein AhrC, welches als Repressor für die Transkription des *argC*-Operons fungiert (5.2.2). Beide Klassen von Mutationen führen aller Wahrscheinlichkeit nach zu einer verschlechterten Bindung des Transkriptionsrepressors AhrC an seine Operatorregion im Promotorbereich des *argC*-Operons und folglich, wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen konnten, zu einer erhöhten Expression des *argC*-Operons (5.2.5, 5.2.6) und zu größeren Ornithin-Pools in der Zelle. Ornithin kann wiederum mittels der Ornithin- δ -Aminotransferase RocD, einem Enzym des Argininkatabolismus, in γ -Glutamyl-Semialdehyd umgewandelt werden (Gardan *et al.*, 1995). Hierbei handelt es sich um das gleiche Reaktionsprodukt, welches auch von ProA katalysiert wird. Diese Verbindung kann mittels der Δ^1 -Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase (Prol, ProH, ProG) zu Prolin umgewandelt werden. Demzufolge können die durch ProB und ProA katalysierten Schritte der Prolinbiosynthese durch die Rekrutierung von Enzymen des Argininmetabolismus umgangen werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Suppressormutanten sind hierbei in der Lage osmoprotektive Prolinlevel via *de novo* Synthese zu akkumulieren (5.2.7, 5.2.8).

In vorangegangenen Untersuchungen wurden bereits Suppressormutanten charakterisiert, welche ebenfalls befähigt waren durch Punktmutationen über die Rekrutierung von Proteinen des Arginin-Stoffwechsels eine Deletion von ProA zu umgehen (Zaprasis *et al.*, 2014). Äquivalent zu der vorliegenden Arbeit wurden hierbei Mutationen in einem Regulatorprotein (RocR) und Mutationen im Promotorbereich eines Genclusters des Argininstoffwechsels (*rocDEF*) angehäuft. Das *rocDEF*-Operon codiert für Gene, die am Arginin-Abbau beteiligt sind (Ali *et al.*, 2003; Gardan *et al.*, 1995). RocR ist der Transkriptionsaktivator des *rocDEF*-Operons (Gardan *et al.*, 1997; Calogero *et al.*, 1994). Aminosäuresubstitutionen im Aktivatorprotein RocR führen zu teilweise Induktor-unabhängigen RocR-Regulatoren. Mutationen in der Promotorregion von *rocDEF* bewirken die Aktivierung eines kryptischen SigA-abhängigen Promotors

(Zaprasis *et al.*, 2014). In beiden Fällen ist die Transkription des *rocDEF*-Operons gesteigert, was die Erhöhung der Menge an RocD in der Zelle zur Folge hatte (Zaprasis *et al.*, 2014). RocD produziert ausgehend von Ornithin dasselbe Produkt wie ProA und kann somit dessen Fehlen ersetzen. Das für diese Reaktion genutzte Ornithin wird aller Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls ausgehend von Glutamat durch Enzyme der Argininbiosynthese gebildet (Baumberg und Klingel, 1993; Mountain *et al.*, 1984). Schlussendlich nutzen die durch Zaprasis *et al.* (2014) beschriebenen Mutanten und die in dieser Arbeit charakterisierten Stämme den gleichen Bypass-Weg zur Umgehung einer ProA-Deletion. Hierbei werden ähnliche molekulare Mechanismen bedient, da in beiden Fällen die Transkription durch die mutationelle Veränderung von Transkriptionsregulatoren und Promotorregionen gesteigert wird. In der vorliegenden Arbeit finden sich die Mutationen in mit dem Argininanabolismus assoziierten Elementen, während die durch Zaprasis *et al.* (2014) beschriebenen Mutationen in Elementen des Argininkatabolismus auftreten. Anders als in der vorliegenden Arbeit konnten die durch Zaprasis *et al.* (2014) charakterisierten Mutanten keine osmoprotektiven Prolin-Level via *de novo*-Synthese aufbauen und waren lediglich dazu in der Lage die anabole Prolinsynthese aufrecht zu erhalten.

In der Literatur gibt es viele Beispiele für eine enge Vernetzung von Prolinbiosynthese und Argininmetabolismus. In *E. coli* und *Salmonella typhimurium* führt die Deletion von *proA* genau wie in der vorliegenden Arbeit zu Suppressormutationen des Argininbiosyntheseweges, welche den Defekt im Stoffwechselweg ausgleichen (Kuo und Stocker, 1969; Berg und Rossi, 1974). In diesen beiden Organismen sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen hingegen völlig andere. ProA-Suppressoren in *E. coli* und *S. typhimurium* weisen Mutationen auf, welche eine Inaktivierung der N-Acetyl-Ornithin-Aminotransferase ArgD, eines Enzyms der Argininbiosynthese, zur Folge haben (Berg und Rossi, 1974; Kuo und Stocker, 1969; Itikawa *et al.*, 1968). Die folglich verursachte Blockade in der Argininbiosynthese führt zu einer Akkumulation des Zwischenproduktes N-Acetylglutamat- γ -Semialdehyd, welches durch das Enzym ArgJ, dessen eigentliches Substrat N-Acetyl-Ornithin ist, unspezifisch in γ -Glutamyl-Semialdehyd umgewandelt wird. In *E. coli* und *S. typhimurium* kommt es demnach zur Evolution eines völlig neuen Stoffwechselschrittes. Im Gegensatz dazu nutzen die in dieser Arbeit charakterisierten Suppressormutanten den bereits vorhandenen

Argininbiosyntheseweg, um erhöhte Ornithinmengen zu akkumulieren, die auf direktem Weg durch ein Enzym des Argininkatabolismus in γ -Glutamyl-Semialdehyd umgewandelt werden können. Hierbei erfolgt die Anpassung auf regulatorischer Ebene durch die Veränderung der Eigenschaften des Aktivatorproteins AhrC und der *argC*-Promotorregion (5.2.2).

Einige bakterielle Vertreter sind in der Lage Prolin unabhängig von den drei beschriebenen Prolinbiosyntheseenzymen direkt aus Ornithin zu produzieren. Die Reaktion wird durch die Ornithin-Cyclodeaminase katalysiert. Dieser Weg der Prolinsynthese ist unter anderem für *Clostridium sporogenes* und *Clostridium botulinum* beschrieben (Muth und Costilow, 1974 a, b; Costilow und Laycock, 1969, 1971). Gene, die für mögliche Ornithin-Cyclodeaminasen kodieren, wurden auch in den Genomen von *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* und *Clostridium difficile* identifiziert (Belitsky, 2002). Bisher ist hierbei ungeklärt, ob es Organismen gibt, welche die vollständige Prolinbiosynthese über diese Route realisieren können, oder ob dieser Weg lediglich für die Prolinproduktion aus exogen bereitgestelltem Arginin oder Ornithin dient. *B. subtilis* verfügt über kein potentiell Gen, das für eine Ornithin-Cyclodeaminase codiert.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Suppressormutanten sind in der Lage eine *proBA*-Deletion auszugleichen, indem sie ausgehend von Glutamat über Enzyme der Argininbiosynthese (*argC*-Operon) Ornithin produzieren, welches durch ein Enzym des Argininkatabolismus (RocD) in γ -Glutamyl-Semialdehyd umgewandelt wird. Darüber hinaus besitzt *B. subtilis* die Möglichkeit extrazelluläres Ornithin oder die verwandten Aminosäuren Arginin oder Citrullin als Prolinquelle zu nutzen (Belitsky *et al.*, 2001; Buxton, 1980; Baumberg und Harwood, 1979). Hierbei wird Arginin durch die Arginase RocF in Ornithin umgewandelt und anschließend äquivalent zu den Beobachtungen in dieser Arbeit durch die Ornithin-Aminotransferase RocD in γ -Glutamyl-Semialdehyd umgewandelt. In *Staphylococcus aureus*, der über keine zu ProB und ProA aus *B. subtilis* homologen Enzyme verfügt, ist der beschriebene Arginaseweg offensichtlich der Hauptprolinbiosyntheseweg (Townsend *et al.*, 1996).

Mikroorganismen akkumulieren unter hyperosmotischem Stress eine große Bandbreite kompatibler Solute. Eines der wichtigsten kompatiblen Solute für

B. subtilis ist Prolin (Whatmore *et al.*, 1990). Untersuchungen haben gezeigt, dass der Import der proteinogenen Aminosäuren Glutamat, Glutamin, Aspartat, Asparagin und Arginin sowie der nicht-proteinogenen Aminosäuren Ornithin und Citrullin und ihre metabolische Umwandlung in Prolin das Wachstum unter osmotisch ungünstigen Bedingungen fördert (Zaprasis *et al.*, 2015). Glutamat, Glutamin, Aspartat und Asparagin werden hierbei genutzt, um den Glutamatpool aufzufüllen, welcher den Ausgangspunkt für die Prolinbiosynthese darstellt. Arginin, Ornithin und Citrullin werden hingegen in γ -Glutamyl-Semialdehyd, ein Intermediat der Prolinbiosynthese, umgewandelt (Zaprasis *et al.*, 2014). Die osmoprotektierende Wirkung dieser Aminosäuren beruht also lediglich auf deren Umwandlung in das potente kompatible Solut Prolin. Bisher liegen keine Berichte darüber vor, dass eine dieser Aminosäuren selbst als osmotische Schutzsubstanz angehäuft wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte aufgedeckt werden, dass der Wachstumsphänotyp einiger Suppressormutanten nicht einzig und allein auf die Fähigkeit zur gesteigerten Prolinakkumulation zurückzuführen ist (5.2.10). HPLC-Analysen konnten einen konkreten Hinweis erbringen, dass diese Suppressoren stark erhöhte intrazelluläre Argininlevel anhäufen (5.2.10). Untersuchungen eukaryotischer Organismen haben gezeigt, dass osmotischer Stress eine Akkumulation der Aminosäuren Arginin, Leucin, Alanin, Valin und Glutamin in den Wurzeln von *Oryza sativa* bewirkt (Dubey *et al.*, 1989; Alpaslan *et al.*, 1999; Hien *et al.*, 2003; Babu *et al.*, 2005). Für verschiedene Springschwanz-Spezies konnte neben Prolin eine Akkumulation von Arginin und Alanin nachgewiesen werden (Holmstrup *et al.*, 2015). Auch für die Hefe *Candida glabrata* konnte die protektierende Wirkung von Arginin gezeigt werden. Hierbei stellte sich Arginin vergleichend zum Prolin sogar als die bessere osmoprotektierende Substanz heraus (Xu *et al.*, 2011).

Hohe intrazelluläre Argininkonzentrationen erscheinen zunächst überraschend, da diese Aminosäure aufgrund ihrer positiven Ladung Enzym-inhibierende Effekte aufweist. So führt die Komplexbildung von Arginin mit negativ geladenen Molekülen, wie z.B. phosphorylierten Intermediaten des Metabolismus (z.B. ADP oder ATP) zu einer eingeschränkten Bindung dieser anionischen Liganden an Enzyme (Hochachka und Somero, 2002). Es ist denkbar, dass diese potentiell negativen Auswirkungen des Arginins durch andere kompatible Solute ausgeglichen werden können, welche lediglich positive Effekte aufweisen (z.B. Prolin) (Hochachka und Somero, 2002). Positive Effekte des Arginins sind ebenfalls

bekannt. So stabilisiert diese Aminosäure künstliche Phospholipidmembranen während Kälte-induzierter Dehydrierung (Anchordoguy *et al.*, 1988) und vermittelt Kälteprotektion in Hefezellen (Morita *et al.*, 2002)

Obwohl die Aminosäure Arginin hinsichtlich ihrer primären Funktion nicht in die osmotische Stressresistenz von *B. subtilis* involviert ist geben die in dieser Arbeit erhobenen Daten erste Hinweise darauf, dass Arginin unter bestimmten Voraussetzungen eine direkte osmoprotektierende Wirkung in diesem Mikroorganismus übernehmen kann. Die Beteiligung von Arginin an der Osmoprotektion wäre somit auch für andere bakterielle Vertreter denkbar.

Die vorliegende Arbeit gibt neue Einblicke in den Prolinmetabolismus von *B. subtilis*. Sie trägt zum einen zu einem besseren Verständnis der Regulation der Prolinbiosynthese bei. Die gezeigten Daten beweisen, dass die γ -Glutamyl-Kinasen ProB und ProJ aufgrund ihrer unterschiedlichen allosterischen Regulation bestens auf ihre physiologische Funktion im anabolen oder osmoadaptiven Prolinbiosyntheseweg abgestimmt sind. Zum anderen konnte im Rahmen dieser Arbeit ein neuer Weg der Osmoadaption in *B. subtilis* aufgedeckt werden. Die Umgehung der γ -Glutamyl-Phosphat-Reduktase ProA durch die Rekrutierung von Enzymen des Argininanabolismus unterstreicht die enge Verschränkung von Prolin- und Argininmetabolismus und demonstriert die Fähigkeit von Bakterien sich flexibel an Beeinträchtigungen essentieller Stoffwechselwege anzupassen.

7 Literaturverzeichnis

- Alting-Mees MA, Short JM.** 1989. pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res.* **17**:9494.
- Ajouz B, Berrier C, Garrigues A, Besnard M, Ghazi A.** 1998. Release of the thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **273**:26670-26674.
- Agre P, Brown D, Nielsen S.** 1995. Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**:472-483.
- Ali NO, Jeusset J, Larquet E, Le Cam E, Belitsky B, Sonenshein AL, Msadek T, Debarbouille M.** 2003. Specificity of the interaction of RocR with the *rocG-rocA* intergenic region in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **149**:739-750.
- Alpaslan M, Gunes A, Taban S.** 1999. Salinity resistance of certain rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Turk. J. Biol.* **23**:499-506.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Anchordoguy T, Carpenter JF, Loomis SH, Crowe JH.** 1988. Mechanisms of interaction of amino-acids with phospholipid-bilayers during freezing. *Biochim. Biophys. Acta* **946**:299-306.
- Arakawa T, Timasheff SN.** 1985. The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* **47**:411-414.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T.** 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**:195-201.
- Azevedo EC, Rios EM, Fukushima K, Campostakaki GM.** 1993. Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. extraction, purification, and characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **42**:1-9.
- Babu CR, Vijayalakshmi C, Mohandass S.** 2005. Evaluation of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for salt tolerance. *Food Agric. Environ.* **3**:190-194.
- Bacher A, Eberhardt S, Fischer M, Kis K, & Richter G.** 2000. Biosynthesis of vitamin B-2 (riboflavin). *Annu. Rev. Nutr.* **20**:153-167.
- Bai Y, Yang J, Zarrella TM, Zhang Y, Metzger DW, Bai G.** 2014. Cyclic di-AMP impairs potassium uptake mediated by a cyclic di-AMP binding protein in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **196**:614-23.
- Baich A.** 1969. Proline synthesis in *Escherichia coli*. A proline-inhibitable glutamic acid kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* **192**:462-467.
- Barbe V, Cruveiller S, Kunst F, Lenoble P, Meurice G, Sekowska A, Vallenet D, Wang T, Moszer I, Medique C, Danchin A.** 2009. From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **155**:1758-1775.
- Bashir A, Hoffmann T, Kempf B, Xie X, Smits SH, Bremer E.** 2014. Plant-derived compatible solutes proline betaine and betonidine confer enhanced osmotic and temperature stress tolerance to *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **160**:2283-2294.

- Bates LS, Waldren RP, Teare ID.** 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* **39**:205-7.
- Batiza AF, Rayment I, Kung C.** 1999. Channel gate! Tension, leak and disclosure. *Structure* **7**:R99 - R103.
- Baumberg S, Harwood CR.** 1979. Carbon and nitrogen repression of arginine catabolic enzymes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **137**:189-196.
- Baumberg S, Klingel U.** 1993. Biosynthesis of arginine, proline and related compounds, pp. 299-306. *In* Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R. (eds), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria, ASM Press, Washington, DC.
- Belitsky BR.** 2002. Biosynthesis of amino acids of the glutamate and aspartate families, alanine, and polyamines, pp. 203-231. *In* Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (eds), *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells, ASM Press, Washington, DC.
- Belitsky BR, Brill J, Bremer E, Sonenshein AL.** 2001. Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**:4389-4392.
- Belitsky BR, Sonenshein AL.** 2013. Genome-wide identification of *Bacillus subtilis* CodY-binding sites at single-nucleotide resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**:7026-7031.
- Berg CM, Rossi JJ.** 1974. Proline excretion and indirect suppression in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **118**:928-934.
- Bernhardt J, Völker U, Völker A, Antelmann H, Schmid R, Mach H, Hecker M.** 1997. Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis* - a two-dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology.* **143**:999-1017.
- Bligh EG, Dyer WJ.** 1959. A rapid method of lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911-917.
- Blount P, Schroeder MJ, Kung C.** 1997. Mutations in a bacterial mechanosensitive channel change the cellular response to osmotic stress. *J. Biol. Chem.* **272**:32150-32157.
- Blount P, Moe PC.** 1999. Bacterial mechanosensitive channels: integrating physiology, structure and function. *Trends Microbiol.* **7**:420-424.
- Boch J, Kempf B, Bremer E.** 1994. Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *J. Bacteriol.* **176**:5364-5371.
- Bolen DW, Baskakov IV.** 2001. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J. Mol. Biol.* **310**:955-963.
- Booth IR, Louis P.** 1999. Managing hypoosmotic stress: aquaporins and mechanosensitive channels in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:166-169.
- Booth IR.** 2014. Bacterial mechanosensitive channels: progress towards an understanding of their roles in cell physiology. *Curr. Opin. Microbiol.* **18**:16-22.
- Bovell CR, Packer L, Helgerson R.** 1963. Permeability of *Escherichia coli* to organic compounds and inorganic salts measured by light scattering. *Biochim. Biophys. Acta.* **75**:257-266.
- Bradford, MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

- Bremer E, Kraemer R.** 2000. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes, pp. 79-97. In Storz G, Hengge-Aronis R (eds), *Bacterial stress response*, ASM Press, Washington, DC.
- Bremer, E.** 2002. Adaptation to changing osmolarity, pp. 385-391. In Sonenshein AL, *et al.* (eds), *Bacillus subtilis* and its closest relatives, ASM Press, Washington, DC.
- Brill J, Hoffmann T, Putzer H, Bremer E.** 2011 a. T-box-mediated control of the anabolic proline biosynthetic genes of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **157**:977-987.
- Brill J, Hoffmann T, Bleisteiner M, Bremer E.** 2011 b. Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *J. Bacteriol.* **193**:5335-5346.
- Brinsmade SR, Alexander EL, Livny J, Stettner A, Segre D, Rhee KY, Sonenshein AL.** 2014. Hierarchical expression of genes controlled by the *Bacillus subtilis* global regulatory protein CodY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**:8227-8232.
- Brown AD.** 1976. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**:803-846.
- Burg M, Kwon E, Kültz D.** 1997. Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu. Rev. Physiol.* **59**:437-455.
- Buxton RS.** 1980. Selection of *Bacillus subtilis* 168 mutants with deletions of the PBSX prophage. *J. Gen. Virol.* **46**:427-437.
- Calamita G, Bishani WR, Preston GM, Guggine WB, Agre P.** 1995. Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**:29063-66.
- Calamita G, Kempf B, Bonhivers M, Bishai WR, Bremer E, Agre P.** 1998. Regulation of the *Escherichia coli* water channel gene *aqpZ*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:3627-3631.
- Calamita G.** 2000. The *Escherichia coli* aquaporin-Z water channel. *Mol. Microbiol.* **37**:254-262.
- Calogero S, Gardan R, Glaser P, Schweizer J, Rapoport G, Debarbouille M.** 1994. RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis*, belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional activators. *J. Bacteriol.* **176**:1234-1241.
- Carpita NC.** 1985. Tensile strength of cell walls of living cells. *Plant Physiol.* **79**:485-88.
- Chang AC, Cohen SN.** 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**:1141-1156.
- Chen M, Cao J, Zheng C, Liu Q.** 2006. Directed evolution of an artificial bifunctional enzyme, gamma-glutamyl kinase/gamma-glutamyl phosphate reductase, for improved osmotic tolerance of *Escherichia coli* transformants. *Fems Microbiol. Lett.* **263**:41-47.
- Chen MQ, Wie HB, Cao JW, Liu RJ, Wang YL, Zheng CY.** 2007. Expression of *Bacillus subtilis* *proBA* genes and reduction of feedback inhibition of proline synthesis increases proline production and confers osmotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **40**:396-403.
- Chopin A, Biaudet V, Ehrlich SD.** 1998. Analysis of the *Bacillus subtilis* genome sequence reveals nine new T-box leaders. *Mol. Microbiol.* **29**:662-664.
- Cohen GN, Rickenberg RH.** 1956. Concentration spécifique reversible des amino acides chez *E. coli*. *Ann. Inst. Pasteur Paris.* **91**:693-720.

- Condon C, Grunberg-Manago M, Putzer H.** 1996. Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in *Bacillus subtilis*. *Biochimie* **78**:381-389.
- Corratge-Faillie C, Jabnourne M, Zimmermann S, Very AA, Fizames C, & Sentenac H.** 2010. Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**:2511-2532.
- Corrigan RM, Grundling A.** 2013. Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**:513-24.
- Costilow RN, Laycock L.** 1969. Reactions involved in the conversion of ornithine to proline in *Clostridia*. *J. Bacteriol.* **100**:662-667.
- Costilow RN, Laycock L.** 1971. Ornithine cyclase (deaminating): purification of a protein that converts ornithine to proline and definition of the optimal assay conditions. *J. Biol. Chem.* **246**:6655-6660.
- Craig LC, Gregory JD, & Barry GT.** 1949. Purity studies on polypeptide antibiotics: bacitracin. *J. Clin. Invest.* **28**:1014-1017.
- Curtis TP, Sloan WT.** 2004. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:221-226.
- Csonka LN, Gelvin SB, Goodner BW, Orser CS, Siemieniak D, Slightom JL.** 1988. Nucleotide Sequence of a mutation in the *proB* gene of *Escherichia coli* that confers proline overproduction and enhanced tolerance to osmotic stress. *Gene* **64**:199-205.
- Csonka LN.** 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**:121-147.
- Csonka LN, Epstein W.** 1996. Osmoregulation, pp. 1210-1223. In Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (eds), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, ASM Press, Washington, DC.
- Cutting SM, Vander Horn PB.** 1990. Genetic analysis, pp. 27-74. In Harwood CR, Cutting SM (eds), *Molecular biological methods for Bacillus*, John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK.
- Czonka LN, Leisinger T.** 2007. Biosynthesis of proline, Chapter 34.6.1.4. In Böck A, et al. (eds), *EcoSal - Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, ASM Press, Washington, DC.
- Czaplewski LG, North AK, Smith MC, Baumberg S, Stockley PG.** 1992. Purification and initial characterization of AhrC: the regulator of arginine metabolism genes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **6**:267-75.
- da Costa MS, Santos H, Galinski EA.** 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*, pp. 117-153. In Scheper T, et al. (eds), *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, Springer, Berlin.
- Dandekar AM, Uratsu SL.** 1988. A single base pair change in proline biosynthesis genes causes osmotic stress tolerance. *J. Bacteriol.* **170**:5943-5945.
- Delamarche C, Thomas D, Rolland JP, Froger A, Gouranton J, Svelto M, Agre P, Calamita C.** 1999. Visualization of AqpZ-mediated water permeability in *Escherichia coli* by cryoelectron microscopy. *J. Bacteriol.* **181**:4193 - 4197.

- Delauney AJ, Verma DP.** 1990. A soybean gene encoding Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate-reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. *Mol. Gen. Genet.* **221**:299-305.
- Delauney AJ, Verma DP.** 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* **4**:215-223.
- Delauney AJ, Hu CA, Kishor PB, Verma DP.** 1993. Cloning of ornithine δ -aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **268**:18673-18678.
- Dennis C CA, Glykos NM, Parsons MR, Phillips SE.** 2002. The structure of AhrC, the arginine repressor/activator protein from *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **58**:421-430.
- Dolezal M.** 2006. Die stressprotektive Wirkung von Aminosäuren in *Bacillus subtilis*: Endogene Synthese von Prolin und die GltT-vermittelte Aufnahme von Glutamat und Aspartat zum Schutz vor Hyperosmolarität und Hitze. Philipps Universität Marburg.
- Dubey RS, Rani M.** 1989. Salinity induced accumulation of free amino-acids in germinating rice seeds differing in salt tolerance. *J. Agron. Crop Sci.* **163**:236-247.
- Earl AM, Losick R, Kolter R.** 2008. Ecology und genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.* **16**:269-275.
- Errington J.** 1993. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**:1-33.
- Fichmann Y, Gerdes SY, Kovacs H, Szabados L, Zilberstein A, Czonka L.** 2015. Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. *Biol. Rev.* **90**:1065-1099.
- Fisher SH.** 1993. Utilization of amino acids and other nitrogen-containing compounds, pp. 221-235. In Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (eds), *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria, ASM Press, Washington, DC.
- Foster PL.** 2007. Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **42**:373-397.
- Fujita T, Maggio A, Garcia-Rios M, Bressan RA, Csonka LN.** 1998. Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionary divergent genes for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase. *Plant Physiol.* **118**:661-674.
- Fujisawa M, Wada Y, Ito M.** 2004. Modulation of the K⁺ efflux activity of *Bacillus subtilis* YhaU by YhaT and the C-terminal region of YhaS. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**:211-7.
- Fujisawa M, Ito M, & Krulwich TA.** 2007. Three two-component transporters with channel-like properties have monovalent cation/proton antiport activity. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **104**:13289-13294.
- Fujita T, Maggio A, Garcia-Rios M, Stauffacher C, Bressan R, Csonka L.** 2003. Identification of regions of the tomato γ -Glutamyl Kinase that are involved in allosteric regulation by proline. *J. Biol. Chem.* **278**:14203-14210.
- Galinski EA.** 1993. Compatible solutes of halophilic eubacteria: Molecular principles, water solute interactions, stress protection. *Experientia* **49**:487-496.
- Galinski EA, Trüper HG.** 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**:95-108.

- Gardan R, Rapoport G, Debarbouille M.** 1995. Expression of the *rocDEF* operon involved in arginine catabolism in *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. **249**:843-856.
- Gardan R, Rapoport G, Debarbouille M.** 1997. Role of the transcriptional activator RocR in the arginine-degradation pathway of *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **24**:825-837.
- Garnett JA, Baumberg S, Stocklay PG, Phillips SEV.** 2007 a. A high-resolution structure of the DNA-binding domain of AhrC, the arginine repressor/activator protein from *Bacillus subtilis*. Acta Cryst. **63**:914-917.
- Garnett JA, Baumberg S, Stocklay PG, Phillips SEV.** 2007 b. Structure of the C-terminal effector-binding domain of AhrC bound to its corepressor L-arginine. Acta Cryst. **63**:918-921.
- Garnett JA, Marincs F, Baumberg S, Stockley PG, Phillips SE.** 2008. Structure and function of the arginine repressor-operator complex from *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. **379**:284-298.
- Gotsche S, Dahl MK.** 1995. Purification and characterization of the phospho- α -(1,1)-glucosidase (TreA) of *Bacillus subtilis* 168. J. Bacteriol. **177**:2721-6.
- Gouffi K, Blanco C.** 2000. Is the accumulation of osmoprotectant the unique mechanism involved in bacterial osmoprotection? Int. J. Food Microbiol. **55**:171-174.
- Grandoni JA, Zahler SA, Calvo JM.** 1992. Transcriptional regulation of the *ilv-leu* operon of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **174**:3212-3219.
- Green NJ, Grundy FJ, Henkin TM.** 2010. The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule. FEBS Lett. **584**:318-324.
- Grundy FJ, Henkin TM.** 1993. tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*. Cell **74**:475-482.
- Grundy FJ, Rollins SM, Henkin TM.** 1994. Interaction between the acceptor end of tRNA and the T box stimulates antitermination in the *Bacillus subtilis* *tyrS* gene: a new role for the discriminator base. J. Bacteriol. **176**:4518-4526.
- Guerrero R, Berlanga M.** 2006. Life's unity and flexibility: the ecological link. Int. Microbiol. **9**:225-235.
- Gutiérrez-Preciado A, Henkin TM, Grundy FJ, Yanofsky C, Merino E.** 2009. Biochemical features and functional implications of the RNA-based T-box regulatory mechanism. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **73**:36-61.
- Guttenplan SB, Shaw S, Kearns DB.** 2013. The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **87**:211-229.
- Hahne H, Mäder U, Otto A, Bonn F, Steil L, Bremer E, Hecker M, Becher D.** 2010. A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation. J. Bacteriol. **192**:870-882.
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**:557-580.
- Härtig E, Jahn D.** 2012. Regulation of the anaerobic metabolism in *Bacillus subtilis*. Adv. Microb. Physiol. **61**:195-216.
- Harwood CR, Archibald AR.** 1990. Growth, maintenance and general techniques, pp. 1-26. In Harwood CR, Cutting SM (eds), Molecular biological methods for *Bacillus*, John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK.

- Harwood CR, Cutting SM.** 1990. Molecular biological methods for *Bacillus*, John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK.
- Hayzer DJ, Leisinger T.** 1980. The gene-enzyme relationships of proline biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. **118**:287-293.
- Hecker M, Schumann W, Völker U.** 1996. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **19**:417-428.
- Hecker M, Völker U.** 1998. Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the s^B regulon. Mol. Microbiol. **29**:1129-1136.
- Helfert C, Gotsche S, Dahl MK.** 1995. Cleavage of trehalose-phosphate in *Bacillus subtilis* is catalyzed by a phospho- α -(1-1)-glucosidase encoded by the *treA* gene. Mol. Microbiol. **16**:111-20.
- Henkin TM, Glass BL, Grundy FJ.** 1992. Analysis of the *Bacillus subtilis* *tyrS* gene: conservation of a regulatory sequence in multiple tRNA synthetase genes. J. Bacteriol. **174**:1299-1306.
- Henkin TM.** 2008. Riboswitch RNAs: using RNA to sense cellular metabolism. Genes Dev. **22**:3383-3390.
- Hien DT, Jacobs M, Angenon G, Hermans C, Thu TT, Van Son L, et al.** 2003. Proline accumulation and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. Plant Sci. **165**:1059-1068.
- Hochachka P, Somero G.** 2002. Biochemical Adaptation. Mechanism and Process in Physiological Evolution, Oxford University Press, NY.
- Hoffmann T, Boiangiu C, Moses S, Bremer E.** 2008. Responses of *Bacillus subtilis* to Hypotonic Challenges: Physiological Contributions of Mechanosensitive Channels to Cellular Survival. Appl. Environ. Microbiol. **74**:2454-2460.
- Hoffmann T, Bremer E.** 2011. Protection of *Bacillus subtilis* against Cold Stress via Compatible-Solute Acquisition. J. Bacteriol. **193**:1552-1562.
- Hohmann S.** 1997. Shaping up: the response of yeast to osmotic stress, pp. 101-145. In Hohmann S, Mager WH (eds), Yeast stress responses, Springer, Berlin, Germany.
- Holmstrup M, Slotsbo S, Rozsypal J, Henriksen PG, Baylay M.** 2015. Accumulation of free amino acids during exposure to drought in three springtail species. J. Insect Physiol. **82**:114-121.
- Höltje JV.** 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**:181-203.
- Holtmann G, Bakker EP, Uozumi N, Bremer E.** 2003. KtrAB and KtrCD: two K^+ uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. J. Bacteriol. **185**:1289-1298.
- Holtmann G, Bremer E.** 2004. Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: Involvement of Opu transporters. J. Bacteriol. **186**:1683-1693.
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma DP.** 2000. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiol. **122**:1129-1136.
- Hu CA, Delauney AJ, Verma DP.** 1992. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**:9354-9358.

- Itikawa H, Baumberg S, Vogel HJ.** 1968. Enzymatic basis for a genetic suppression: accumulation and deacylation of N-acetylglutamic γ -semialdehyde in enterobacterial mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **159**:547-550.
- Ivanova EP, Vysotskii MV, Svetashev VI, Nedashkovskaya OI, Gorshkova NM, Mikhailov VV, Yumoto N, Shigeri Y, Taguchi T, Yoshikawa S.** 1999. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *Int. Microbiol.* **2**:267-271.
- Johansson I, Karlsson M, Johanson U, Larsson C, Kjellbom P.** 2000. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochem. Biophys. Acta.* **1465**:324-342.
- Kappes RM, Kempf B, Bremer E.** 1996. Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: Characterization of OpuD. *J. Bacteriol.* **178**:5071-5079.
- Kappes RM, Kempf B, Kneip S, Boch J, Gade J, Meier-Wagner J, Bremer E.** 1999. Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **32**:203-216.
- Kempf B, Bremer E.** 1995. OpuA, an osmotically regulated binding protein-dependent transport system for the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **270**:16701-16713.
- Kempf B, Gade J, Bremer E.** 1997. Lipoprotein from the osmoregulated ABC transport system OpuA of *Bacillus subtilis*: purification of the glycine betaine binding protein and characterization of a functional lipidless mutant. *J. Bacteriol.* **179**:6213-6220.
- Kempf B, Bremer E.** 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**:319-330.
- Kempf B, Bremer E.** 2000. Water – deficient environments, pp. 884-897. *In* Encyclopedia of Microbiology, Academic Press.
- Koch AL.** 1982. On the growth and form of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **128**:2527-2540.
- Koch AL.** 1984. Shrinkage of growing *Escherichia coli* cells by osmotic stress. *J. Bacteriol.* **159**:919-924.
- Koecher S, Averhoff B, & Mueller V.** 2011. Development of a genetic system for the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*: generation and characterization of mutants defect in the production of the compatible solute proline. *Environ. Microbiol.* **13**:2122-2131.
- Kosuge T, Hoshino T.** 1998. Construction of a proline-producing mutant of the extremely thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus* HB27. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4328-4332.
- Kunkel TA.** 2004. DNA replication fidelity. *J. Biol. Chem.* **279**:16895-16898.
- Kunst F, Rapoport G.** 1995. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:2403-2407.
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S, et al.** 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249-256.
- Kuo TT, Stocker BA.** 1969. Suppression of proline requirement of *proA* and *proAB* deletion mutants in *Salmonella typhimurium* by mutation to arginine requirement. *J. Bacteriol.* **98**:593-598.
- Kuwayama H, Obara S, Morio T, Katoh M, Urushihara H, Tanaka Y.** 2002. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Res.* **30**:E2.

- Lechat P, Hummel L, Rousseau S, Moszer I.** 2008. GenoList: an integrated environment for comparative analysis of microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* **36**:D469-D474.
- Levina N, Totemeyer S, Stokes NR, Louis P, Jones MA, Booth IR.** 1999. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *EMBO J.* **18**:1730-1737.
- Li C, Boileau AJ, Kung C, Adler J.** 1988. Osmotaxis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:9451-9455.
- Liu RJ, Chen T, Cao JW.** 2005. Construction of fused osmoregulation *proBA* gene from a salt-tolerant mutant of *B. subtilis* and its influence on the osmotolerance of *Escherichia coli*. *Acta Microbiol. Sin.* **45**:23-26.
- Löblich S.** 2015. Das DegS-DegU Zwei-Komponenten System und dessen Rolle bei der Regulation des osmotisch induzierbaren *yqiHIK* Operons aus *Bacillus subtilis*. Philipps Universität Marburg.
- Mäder U, Schmeisky AG, Florez LA, & Stuelke J.** 2012. SubtiWiki - a comprehensive community resource for the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **40**:D1278-D1287.
- Maggio A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas JI, Damsz B, Narasimhan ML, Hasegawa PM, Joly RJ, Bressan RA.** 2002. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *Plant J.* **31**:699-712.
- Marco-Marin C, Gil-Ortiz F, Perez-Arellano I, Cervera J, Fita I, Rubio V.** 2007. A novel two-domain architecture within the amino acid kinase enzyme family revealed by the crystal structure of *Escherichia coli* glutamate-5-kinase. *J. Mol. Biol.* **367**:1431-1446.
- Marmur J.** 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**:208-218.
- Martin DD, Ciulla RA, Roberts MF.** 1999. Osmoadaptation in *Archaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1815-1825.
- Massarelli I, Forlani G, Ricca E, De Felice M.** 2000. Enhanced and feedback-resistant γ -glutamyl kinase activity of an *Escherichia coli* transformant carrying a mutated *proB* gene of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**:143-147.
- Maurel L.** 1997. Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **48**:399-429.
- Meijer PJ, Lilius G, Holmberg N, Bülow L.** 1996. An artificial bifunctional enzyme, glutamyl kinase/ glutamyl phosphate reductase, improves NaCl tolerance when expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **18**:1133-1138.
- Meury J.** 1988. Glycine betaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **149**:232-239.
- Mevarech M, Frolow F, Gloss LM.** 2000. Halophilic enzymes: protein with a grain of salt. *Biophys. Chem.* **86**:155-164.
- Miao LX, Cao JW, Liu RJ, Wang YL, Zeng YH.** 2002. Cloning and sequencing of the *proBA* gene from the selected mutant resistant to proline analogue from *Bacillus subtilis*. *Acta Genet. Sin.* **29**:1111-1117.
- Miller JH.** 1992. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

- Miller KJ, Wood JM.** 1996. Osmoadaptation by Rhizosphere Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:101-136.
- Miller CM, Baumberg S, Stockley PG.** 1997. Operator interactions by the *Bacillus subtilis* arginine repressor/activator, AhrC: novel positioning and DNA-mediated assembly of a transcriptional activator at catabolic sites. *Mol. Microbiol.* **26**:37-48.
- Moe PC, Blount P, Kung C.** 1998. Functional and structural conservation in the mechanosensitive channel MscL implicates elements crucial for mechanosensation. *Mol. Microbiol.* **28**:583-592.
- Mongkolthanaruk W.** 2012. Classification of *Bacillus* Beneficial Substances Related to Plants, Humans and Animals. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**:1597-1604.
- Morita Y, Nakamori S, Takagi H.** 2002. Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* **94**:390–394.
- Moses S, Sinner T, Zaprasis A, Stoeveken N, Hoffmann T, Belitsky BR, Sonenshein AL, Bremer E.** 2012. Proline Utilization by *Bacillus subtilis*: Uptake and Catabolism. *J. Bacteriol.* **194**:745-758.
- Mountain A, Baumberg S.** 1980. Map locations of some mutations conferring resistance to arginine hydroxamate in *Bacillus subtilis* 168. *Mol. Gen. Genet.* **178**:691-701.
- Mountain A, Mann NH, Munton RN, Baumberg S.** 1984. Cloning of a *Bacillus subtilis* restriction fragment complementing auxotrophic mutants of eight *Escherichia coli* genes of arginine biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **197**:82-89.
- Muth WL, Costilow RN.** 1974 a. Ornithine cyclase (deaminating): II. Properties of the homogenous enzyme. *J. Biol. Chem.* **249**:7457-7462.
- Muth WL, Costilow RN.** 1974 b. Ornithine cyclase (deaminating): III. Mechanism of the conversion of ornithine to proline. *J. Biol. Chem.* **249**:7463-7467.
- Nelson JW, Sudarsan N, Furukawa K, Weinberg Z, Wang JX, Breaker RR.** 2013. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP. *Nat. Chem. Biol.* **9**:834-9.
- Nicolas P, Maeder U, Dervyn E, Rochat T, Leduc A, Pigeonneau N, Bidnenko E, Marchadier E, Hoebeke M, Aymerich S, et al.** 2012. Condition-Dependent Transcriptome Reveals High-Level Regulatory Architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* **335**:1103-1106.
- North AK, Smith MCM, Baumberg S.** 1989. Nucleotide sequence of a *Bacillus subtilis* arginine regulatory gene and homology of its product to the *Escherichia coli* arginine repressor. *Gene* **80**:29-38.
- Omori K, Suzuki S, Imai Y, Komatsubara S.** 1992. Analysis of the mutant *proBA* operon from a proline-producing strain of *Serratia marcescens*. *J. Gen. Microbiol.* **138**:693-699.
- Oren A.** 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* **4**:2.
- Perez-Arellano I, Carmona-Alvarez F, Martinez AI, Rodriguez-Diaz J, Cervera J.** 2010 a. Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: From Osmotolerance to rare metabolic disease. *Protein Sci.* **19**:372-382.
- Perez-Arellano I, Carmona-Alvarez F, Gallego J, Cervera J.** 2010 b. Molecular mechanism modulating glutamate kinase activity. Identification of the proline inhibitor binding site. *J. Mol. Biol.* **404**:890-901.

- Perez-Arellano I, Rubio V, Cervera J.** 2006. Mapping active site residues in glutamate-5-kinase. The substrate glutamate and the feed-back inhibitor proline bind at overlapping sites. *FEBS Lett.* **580**:6247-6253.
- Petersohn A, Brigulla M, Haas S, Hoheisel JD, Völker U, Hecker M.** 2001. Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**:5617-5631.
- Pierce JA, Robertson CR, & Leighton TJ.** 1992. Physiological and genetic strategies for enhanced subtilisin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Prog.* **8**:211-218.
- Pittelkow M, Bremer E.** 2011. Cellular adjustment of *Bacillus subtilis* and other *Bacilli* to fluctuating salinities, pp. 275-302. *In* Ventosa AO, Ma Y (eds), *Halophiles and hypersaline environments - Current research and future trends*, Springer, Heidelberg.
- Potts M.** 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **58**:755-805.
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P.** 1992. Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **256**:385-387.
- Price CW, Fawcett P, Ceremonie H, Su N, Murphy CK, Youngman P.** 2001. Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **41**:757-774.
- Price CW.** 2000. Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria, pp. 179-197. *In* Storz G, Hengge-Aronis R (eds), *Bacterial stress responses*, ASM Press, Washington, DC.
- Prindle A, Liu J, Asally M, Ly S, Garcia-Ojalvo J, Suel GM.** 2015. Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. *Nature* **527**:59-63.
- Putzer H, Gendron N, Grunberg-Manago M.** 1992. Co-ordinate expression of the two threonyl-tRNA synthetase genes in *Bacillus subtilis*: control by transcriptional antitermination involving a conserved regulatory sequence. *EMBO J.* **11**:3117-3127.
- Putzer H, Laalami S, Brakhage AA, Condon C, Grunberg-Manago M.** 1995. Aminoacyl-tRNA synthetase gene regulation in *Bacillus subtilis*: induction, repression and growth rate regulation. *Mol. Microbiol.* **16**:709-718.
- Putzer H, Condon C, Brechemier-Baey D, Brito R, Grunberg-Manago M.** 2002. Transfer RNA-mediated antitermination *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **30**:3026-3033.
- Qu Y, Bolen CL, Bolen DW.** 1998. Osmolyte driven contraction of a random coil protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9268-9273.
- Ringler P, Borgnia MJ, Stahlberg H, Maloney PC, Agre P, Engel A.** 1999. Structure of the water channel AqpZ from *Escherichia coli* revealed by electron crystallography. *J. Mol. Biol.* **291**:1181-1190.
- Roberts MF.** 2000. Osmoadaptation and osmoregulation in *Archaea*. *Front Biosci.* **5**:796-812.
- Rushlow KE, Deutch AH, Smith CJ.** 1985. Identification of a mutation that relieves γ -glutamyl kinase from allosteric feedback inhibition by proline. *Gene* **39**:109-112.
- Ruzal SM, Lopez C, Rivas E, Sanchez-Rivas C.** 1998. Osmotic strength blocks sporulation at stage II by impeding activation of early sigma factors in *Bacillus subtilis*. *Curr. Microbiol.* **36**:75-79.
- Ruzal SM, Sanchez-Rivas C.** 1998. *In Bacillus subtilis* DegU-P is a positive regulator of the osmotic response. *Curr. Microbiol.* **37**:368-72.

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
- Sakamoto A, Murata N.** 2000. Genetic engineering of glycine betaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **51**:34281-34288.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TE.** 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sargent MG.** 1975. Control of cell length in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **123**:7-19.
- Saum SH, Müller V.** 2007. Salinity-dependent switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *J. Bacteriol.* **189**:6968-6975.
- Schöck F, Dahl M.** 1996. Analysis of DNA flanking the *treA* gene of *Bacillus subtilis* reveals genes encoding a putative specific enzyme IITre and a potential regulator of the trehalose operon. *Gene* **17**:59-63.
- Schroeter R, Hoffmann T, Voigt B, Meyer H, Bleisteiner M, Muntel J, Jürgen B, Albrecht D, Becher D, Lalk M, Evers S, Bongaerts J, Maurer KH, Putzer H, Hecker M, Schweder T, Bremer E.** 2013. Stress responses of the industrial workhorse *Bacillus licheniformis* to osmotic challenges. *PloS One* **8**:e80956.
- Sekine T, Akari K, Yoshimitsu H, Hiroshi T.** 2007. Desensitization of Feedback Inhibition of the *Saccharomyces cerevisiae* γ -Glutamyl Kinase Enhances Proline Accumulation and Freezing Tolerance. *Appl. Env. Microbiol.* **73**:4011-4019.
- Silhavy T, Berman ML, Enquist LW.** 1984. *Experiments with gene fusion*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sleator RD, Gahan CG, Hill C.** 2001. Mutations in the listerial *proB* gene leading to proline overproduction: effects on salt tolerance and murine infection. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4560-4565.
- Smith CJ, Deutch AH, Rushlow KE.** 1984. Purification and characteristics of a γ -glutamyl kinase involved in *Escherichia coli* proline biosynthesis. *J. Bacteriol.* **157**:545-551.
- Smith MCM, Mountain A, Baumberg S.** 1986. Sequence analysis of the *Bacillus subtilis* *argC* promoter region. *Gene* **49**:53-60.
- Smith MCM, Czaplewski L, North AK, Baumberg S, Stockley PG.** 1989. Sequences required for the regulation of arginine biosynthesis promoters are conserved between *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **3**:23-28.
- Sonnenshein AL.** 2000. Bacterial sporulation: a response to environmental signals, pp. 199-215. *In* Storz G, Hengge-Aronis R (eds), *Bacterial stress responses*. ASM Press, Washington, DC.
- Soupene E, King N, Lee H, & Kustu S.** 2002. Aquaporin Z of *Escherichia coli*: Reassessment of its regulation and physiological role. *J. Bacteriol.* **184**:4304-4307.
- Spiegelhalter F, Bremer E.** 1998. Osmoregulation of the *opuE* proline transport gene from *Bacillus subtilis*: contributions of the sigma A- and sigma B-dependent stress responsive promoters. *Mol. Microbiol.* **29**:285-296.
- Srivatsan A, Han Y, Peng J, Tehranchi AK, Gibbs R, Wang JD, Chen R.** 2008. High-Precision, Whole-Genome Sequencing of Laboratory Strains Facilitates Genetic Studies. *Plos Genetics* **4**:E1000139.

- Steil L, Hoffmann T, Budde I, Völker U, Bremer E.** 2003. Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaption of *Bacillus subtilis* to high salinity. *J. Bacteriol.* **185**:6358-6370.
- Street TO, Bolen DW, Rose GD.** 2006. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:13997-14002.
- Sukharev SI, Blount P, Martinac B, Kung C.** 1997. Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the *mscL* gene, protein and activities. *Annu. Rev. Physiol.* **59**:633-657.
- Sukharev S, Betanzos M, Chlang CS, Guy HR.** 2001. The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL. *Nature* **409**:720-724.
- Tachibana K, Yoda K, Watanabe S, Kadokura H, Katayama Y, Yamane K, Yamasaki M, Tamura G.** 1987. Secretion of *Bacillus subtilis* α -amylase in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:1775-82.
- Tam NK, Uyen NQ, Hong HA, Duc le H, Hoa TT, Serra CR, Henriques AO, Cutting SM.** 2006. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J. Bacteriol.* **188**:2692-2700.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**:2731-2739.
- Tanghe A, Van Dijck P, Thevelein JM.** 2006. Why do microorganisms have aquaporins? *Trends Microbiol.* **14**:78-85.
- Townsend DE, Kaenjak A, Jayaswal RK, Wilkinson BJ.** 1996. Proline is biosynthesized from arginine in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol.* **142**:1491-1497.
- van de Guchte M, Ehrlich SD, Chopin A.** 2001. Identity elements in tRNA-mediated transcription antitermination: implication of tRNA D- and T-arms in mRNA recognition. *Microbiology* **147**:1223-1233.
- van Veen JA, van Overbeek LS, van Elsas JD.** 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:121-135.
- Ventosa A, Nieto JJ, Oren A.** 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:504-544.
- Veeravalli K, Boyd D, Iverson BL, Beckwith J, Georgiou G.** 2011. Laboratory evolution of glutathione biosynthesis reveals natural compensatory pathways. *Nat. Chem. Biol.* **7**:101-105.
- Vitreschak AG, Mironov AA, Lyubetsky VA, Gelfand MS.** 2008. Comparative genomic analysis of T-box regulatory systems in bacteria. *RNA* **14**:717-735.
- Völker U, Maul B, Hecker M.** 1999. Expression of the s^B -dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**:3942-3948.
- von Blohn C, Kempf B, Kappes RM, Bremer E.** 1997. Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol. Microbiol.* **25**:175-187.
- Wach A.** 1996. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**:259-265.
- Wels M, Groot Kormelink T, Kleerebezem M, Siezen RJ, Francke C.** 2008. An *in silico* analysis of T-box regulated genes and T-box evolution in prokaryotes, with emphasis on prediction of substrate specificity of transporters. *BMC Genomics* **9**: 330.

- Welsh DT.** 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:263-290.
- Whatmore AM, Chudek JA, Red RH.** 1990. The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pool of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**:2527-2535.
- Whatmore AM, Reed RH.** 1990. Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.* **136**:2521-2526.
- Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ.** 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6578-6583.
- Widderich N, Rodrigues DC, Commichau FM, Fischer KE, Ramirez-Guadiana FH, Rudner DZ, Bremer E.** 2016. Salt-sensitivity of $\sigma(H)$ and Spo0A prevents sporulation of *Bacillus subtilis* at high osmolarity avoiding death during cellular differentiation. *Mol. Microbiol.* **100**:108-124.
- Winkler WC.** 2007. RNA-mediated regulation in *Bacillus subtilis*, pp. 167-214. In Graumann P (ed), *Bacillus: Cellular and Molecular Biology*, Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Wong LS, Johnson MS, Sandberg LB, Taylor BL.** 1995. Amino acid efflux in response to chemotactic and osmotic signals in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:4342-4349.
- Wood JM, Bremer E, Csonka LN, Kraemer R, Poolman B, van der Heide T, Smith LT.** 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* **130**:437-60.
- Wünsche G.** 2010. Bereitstellung der osmotischen Schutzsubstanz Prolin durch Hydrolyse prolinhaltiger Peptide und Transformation verschiedener Aminosäuren in *Bacillus subtilis*. Philipps Universität Marburg.
- Xu S, Zhou J, Liu L, Chen J.** 2011. Arginine: A novel compatible solute to protect *Candida glabrata* against hyperosmotic stress. *Process Biochem.* **46**:1230-1235.
- Yancy PH.** 1994. Compatible and counteracting solutes, pp. 81-109. In Strange K (ed), *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Harada Y, Shinozaki K.** 1995. Correlation between the induction of a gene for delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J.* **7**:751-760.
- Zapras A, Brill J, Thuring M, Wünsche G, Heun M, Barzantny H, Hoffmann T, Bremer E.** 2013. Osmoprotection of *Bacillus subtilis* through import and proteolysis of proline-containing peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**:576-587.
- Zapras A, Hoffmann T, Wünsche G, Florez L, Stülke J, Bremer E.** 2014. Mutational activation of the RocR activator and of a cryptic *rocDEF* promoter bypass loss of the initial steps of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Env. Microbiol.* **16**:701-717.
- Zapras A, Bleisteiner M, Kerres A, Hoffmann T, Bremer E.** 2015. Uptake of amino acids and their metabolic conversion into the compatible solute proline confers osmoprotection to *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**:250-259.
- Zhang CS, Lu Q, Verma DP.** 1995. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **270**:20491-20496.

Zhilina TN, Zavarzin GA. 1990. Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **87**:315-322.

8 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Die osmotische Schutzsubstanz Prolin: Regulation der Prolinbiosynthese und Bildung eines osmoadaptiven Prolin-Bypass-Weges durch die evolutionäre Anpassung des Argininanabolismus“

selbständig verfasst und keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Sämtliche Textstellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen wurden, sind mit einer Quellenangabe kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Daniela Stecker

Ort, Datum